



Etudes structurales et fonctionnelles de la pompe d'efflux MexAB-OprM impliquée dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*

Laura Monlezun

► To cite this version:

Laura Monlezun. Etudes structurales et fonctionnelles de la pompe d'efflux MexAB-OprM impliquée dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P644 . tel-00801703

HAL Id: tel-00801703

<https://theses.hal.science/tel-00801703>

Submitted on 18 Mar 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
ECOLE DOCTORALE MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE ET ENVIRONNEMENT

THESE
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES
Présentée et soutenue publiquement par
LAURA MONLEZUN

Le 11 Décembre 2012

ETUDES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DE LA POMPE
D'EFFLUX MEXAB-OPRM IMPLIQUEE DANS LA RESISTANCE
AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Membres du jury :

Dr. Isabelle BROUTIN, Directrice de thèse

Pr. Marie-José BUTEL, Examineur

Dr. Jean-Marie PAGES, Examineur

Dr. Isabelle SCHALK, Rapporteur

Dr. Romé VOULHOUX, Rapporteur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Frédéric DARDEL pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques ainsi que Nicolas LEULLIOT et Carine TISNE qui lui ont succédé.

J'adresse mes remerciements chaleureux à Isabelle BROUTIN qui m'a encadrée pendant ces trois années de thèse. Elle m'a accordé toute sa confiance tout en restant disponible et à mon écoute à tout moment. Quel plaisir pour moi d'avoir partagé certaines expériences toutes les deux, « à quatre mains ».

J'exprime ma vive reconnaissance à tous les membres de l'association Vaincre La Mucoviscidose pour leur soutien financier sans lequel ces travaux de thèse n'auraient pu être réalisés.

Je remercie Isabelle SCHALK et Romé VOULHOUX pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Marie José BUTEL et Jean Marie PAGES qui ont apporté leur concours à l'évaluation de mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à Arnaud DUCRUIX, Martin PICARD, Philippe BENAS et Jean François GAUCHER pour avoir consacré une partie de leur temps à la relecture de ce manuscrit.

Merci Philippe de m'avoir laissé un tel degré de liberté dans mes recherches, je garderai en mémoire ta célèbre maxime « qu'un résultat même négatif reste un résultat » ! Merci Martin de m'avoir fait partager ton « effervescence scientifique » lors de nos réunions hebdomadaires ou lors des différents congrès. Un merci chaleureux à Houcine BENHABDELHAK avec qui je ne compte plus les heures passées à émettre des hypothèses toujours plus optimistes puis à échafauder nos plans d'expériences directement sur la paillasse.

Je n'oublie pas dans mes remerciements les autres membres passés et présents de la « Shadock Team » : Yann, Alice et Manuela ; et pour que l'équipe « Signalisation et Transport membranaire » soit au complet, je ne manquerai pas de citer Marie Bernard, Bili et Jef qui par leurs expériences scientifiques personnelles ont enrichi nos discussions.

Tous mes remerciements pour leur sympathie aux membres du laboratoire que j'ai côtoyés pendant ces trois années.

Je remercie l'ensemble des collaborateurs impliqués dans la thématique des pompes d'efflux : Wladimir URBACH, Nicolas TAULIER, Vladimir ADRIEN et Gamal RAYAN du Laboratoire d'Imagerie Paramétrique à l'Ecole Normale Supérieure de Paris ; Bruno LEPIOUFLE, Olivier FRANÇAIS et Wei WANG du Laboratoire SATIE à l'Ecole Normale Supérieure de Cachan ; Patrick PLESIAT, Catherine LLANES et Sophie GUENARD du Laboratoire de Bactériologie à Besançon qui m'ont initiée aux techniques de complémentation *in vivo* et avec qui j'entretiens toujours des échanges scientifiques réguliers.

Un merci tout particulier à Marie José BUTEL et à toute son équipe pour m'avoir laissé libre accès aux paillasse de leur laboratoire pour mes manipulations sur *Pseudomonas aeruginosa*.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Solange MORERA, qui par son dynamisme et son enthousiasme m'a incitée à m'engager dans une thèse. Elle a su chasser mes doutes et l'épanouissement que j'ai atteint au cours de ces trois années, récompense les efforts qu'elle a déployés pour me convaincre. Tu avais raison, je ne regrette pas de m'être lancée dans cette belle aventure !

Je remercierai enfin mes parents qui m'ont toujours laissé libre choix dans mes études et assuré de leur soutien pendant toutes ces années. Que ce travail soit pour eux et pour toute ma famille, le témoignage de toute mon affection.

A Amitchi.

Sommaire

PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , un pathogène opportuniste virulent.....	14
2. Les facteurs de virulence	15
2.1. Les facteurs liés à l'adhérence et à la mobilité	15
2.2. Les facteurs impliqués dans la colonisation de l'hôte.....	16
3. Les antibiotiques, outils pour lutter contre les infections bactériennes	20
4. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques de <i>P. aeruginosa</i>	23
4.1. Résistance naturelle.....	23
4.2. Résistance acquise.....	30
5. La résistance aux antibiotiques par classe	36
5.1. Beta-lactamines, déstabilisation de la paroi bactérienne.....	37
5.2. Aminoglycosides, perturbation de la traduction.....	52
5.3. Fluoroquinolones	58
5.4. Colistine, désorganisation de la membrane	60
6. La multi résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , une impasse thérapeutique ?	64
6.1. Une nouvelle stratégie : contourner le mécanisme d'efflux	64
6.2. Les EPI disponibles actuellement	65
7. Structure et assemblage des pompes d'efflux	69
7.1. Le transporteur RND	70
7.2. La porine de la membrane externe	80
7.3. La protéine de fusion périplasmique (MFP)	88
7.4. L'assemblage	92
8. Présentation de la thèse.....	105
 PARTIE II : MATERIELS & METHODES	 107
1. Biologie Moléculaire.....	108
1.1. Clonage des gènes <i>oprM</i> et <i>mexA</i> dans un vecteur d'expression.....	108
1.2. Mutagenèse dirigée sur le gène <i>oprM</i>	114
2. Microbiologie	122
2.1. Liste des souches utilisées	122
2.2. Préparation de cellules électrocompétentes.....	122
2.3. Antibiogrammes	123
2.4. CMI en milieu gélosé.....	125
2.5. CMI en milieu liquide.....	126
2.6. Cultures de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	127
2.7. Production des protéines recombinantes chez <i>E. coli</i>	128
3. Biochimie	129
3.1. Purification des protéines	129
3.2. BN-PAGE (Blue Native Gel Electrophoresis)	134
3.3. Localisation cellulaire des mutants d'OprM chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	137
4. Modélisation	140
4.1. Modélisation des mutants cliniques de MexZ.....	140
4.2. Modélisation des mutants cliniques d'OprD	140

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSION	141
1. Etude de l'interaction OprM-MexA par BN-PAGE	142
1.1. Principe du BN-PAGE	142
1.2. Choix des protéines de calibration	143
1.3. Importance du détergent.....	145
1.4. Identification des complexes et analyse de la stoechiométrie	146
2. Etude par électrophysiologie de l'ouverture de la porine OprM	155
2.1. Pertinence de l'étude.....	155
2.2. Bref état de l'art de l'électrophysiologie des canaux ioniques	156
2.3. Etude électrophysiologique d'OprM par microfluidique	161
3. Caractérisation de mutants de l'ouverture périplasmique d'OprM par	
complémentation.....	172
3.1. Antibiotogrammes	172
3.2. CMI	177
3.3. Localisation membranaire.....	181
3.4. Interaction avec MexA par BN-PAGE.....	182
3.5. Etude de l'influx à travers OprM.....	185
3.6. Electrophysiologie & Cristallographie	189
3.7. Etude de l'effet des polyamines sur OprM	192
4. Modélisation de mutants cliniques	195
4.1. Modélisation de MexZ	195
4.2. Modélisation d'OprD.....	203
 PARTIE IV: CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	 227
 BIBLIOGRAPHIE	 233
 ANNEXES.....	 251

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Desoxyribo-Nucléique

AHL : acyl homoserine lactone

AMC : acide clavulanique

Amp : Ampicilline

AN ou AKN ou AMK : Amykacine

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ATM : Aztréonam

ATB : antibiotique

β -OG : octyl- β -D-glucopyranoside

BCA : Bicinhoninic Acid

BLM : *Black Lipid Membrane*

BN-PAGE : *Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

BSA : *Bovine Serum Albumin*

C8POE : n-octylpolyoxyethylene

CAZ : Ceftazidime

CFS : Cefsulodine

CIP : Ciprofloxacin

Cm : Chloramphénicol

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNR : Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques

COL ou CS : Colistine

CV : *Column Volume*

DDM : n-Dodecyl β -D-Maltopyranoside

DSP : dithiobis (succinimidyl propionate)

DO : Densité Optique

EPI : *Efflux Pump Inhibitor*

FEP : Céfépime

Gm ou GM : Gentamicine
IMP ou IPM : Imipénème
HSL : homosérinelactone
InVS : Institut Veille Sanitaire
ITC : *Isothermal Titration Calorimetry*
LB : milieu Luria Broth
LBA : milieu LB + Ampicilline 100 µg/mL
LBC : milieu LB + Chloramphénicol 25µg/mL
LPS : Lipopolysaccharide
MER ou MEM : Meropénème
MH : milieu Mueller Hinton
NAG : N-Acétyle Glucosamine
NAM : acide N-Acétyle-Muramique
MFP : *Membrane Fusion Protein*
MW : *molecular weight*
NTA (Ni-NTA) : Nitrilotriacetic Acid
PBP : *Penicillin Binding Proteins*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PDB : *Protein Data Bank*
PIP : Pipéracilline
PQS : *Pseudomonas* Quinolone Signal
PVDF : Polyvinylidene Fluoride
RND : *Resistance Nodulation and cell Division*
RT-PCR : *Reverse Transcription PCR*
SDS : Sodium Dodécyle Sulfate
SPR : *Surface Plasmon Resonance*
SSTT : Système de sécrétion de Type III
TBS : *Tris Buffer Saline*
TBS-T : Tris Buffer Saline + 0,1% (v/v) Tween-20

TCC : Ticarcilline + acide clavulanique

TIC : Ticarcilline

TM : Tobramycine

TZP : Pipéracilline + Tazobactam

UFC : Unité Formant une Colonie

WT : *Wild Type*

% v/v : % par volume (mL) d'un composé par volume de solvant (mL)

% w/v : % en masse (mg) d'un composé par volume de solvant (mL)

PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène opportuniste virulent

Pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique a été isolé pour la première fois en 1872 par Schroeter mais c'est à Carle Gessard que l'on doit sa description complète en 1882. Cette bactérie à Gram négatif qui se caractérise, en particulier, par la production d'un pigment bleu-vert (mélange de pyocyanine et de pyoverdine) est très répandue dans la nature. Saprophyte des sols humides, des végétaux et des eaux (marines, douces ou usées), on la rencontre aussi à l'état commensal chez l'homme (téguments, intestin).

Si ce bacille s'avère quasiment inoffensif sur les individus sains, il est considéré comme le représentant emblématique des « pathogènes opportunistes » du fait de ses redoutables effets chez les individus aux défenses immunitaires défaillantes (patients en réanimation, atteints de pneumopathies, immunodéprimés, ...). L'enquête nationale de prévalence réalisée en 2006 a en effet montré que *Pseudomonas aeruginosa* était responsable de 10% des infections nosocomiales, en troisième position après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* [INVS, 2009 : <http://www.invs.sante.fr/raisin/>]. Les patients atteints de mucoviscidose sont notamment très souvent sujets aux infections à bacille pyocyanique, qui lorsqu'elles ne sont pas rapidement détectées et éradiquées, menacent fortement le pronostic vital. En effet, la conjonction d'un environnement trachéo-bronchique particulier chez ces patients et d'une production par le bacille d'alginate, perturbe l'élimination naturelle de ces microorganismes et favorise la persistance de telles infections. La virulence de *Pseudomonas aeruginosa* repose sur sa capacité à interagir avec son environnement. Cette pathogénicité est en réalité multifactorielle, combinaison complexe de facteurs solubles (toxines...) et d'attributs cellulaires (pili ...) régulés à différents niveaux (Fig. 1A).

2. Les facteurs de virulence

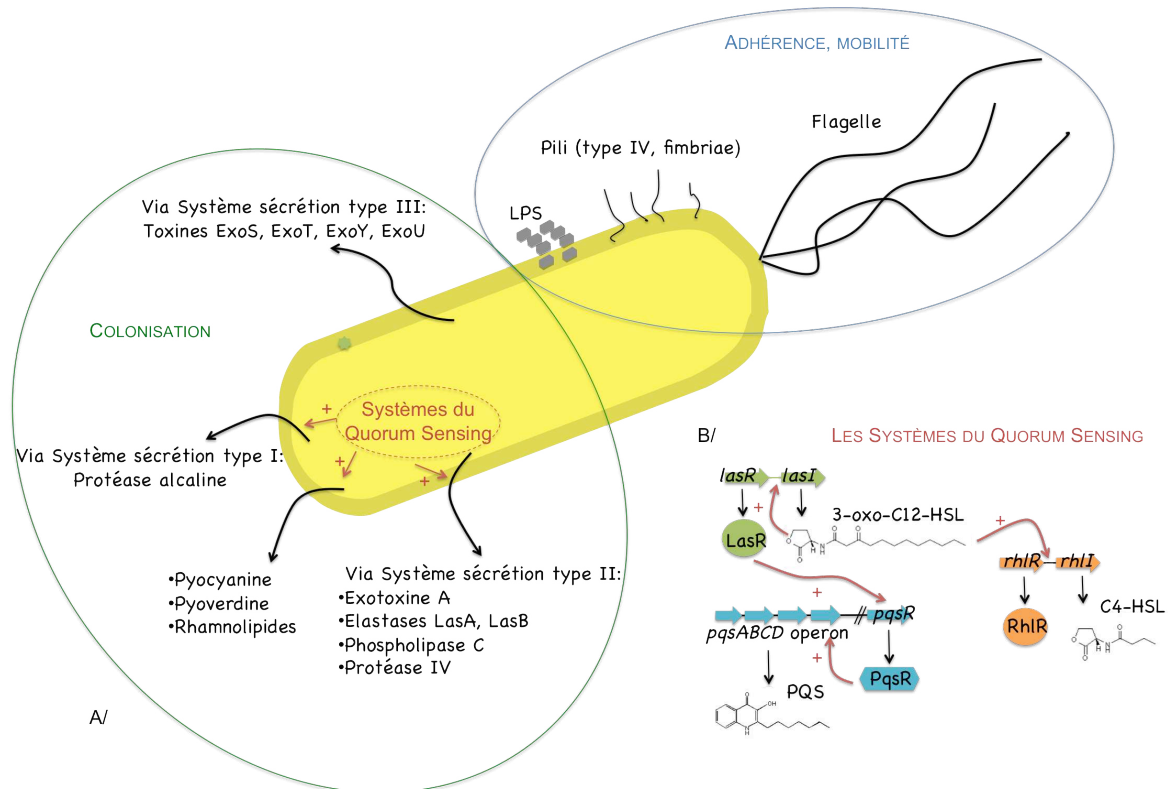


Fig. 1: Les facteurs de virulence *Pseudomonas aeruginosa*

(A) Les facteurs de virulence exprimés par *P. aeruginosa*. Des facteurs sont impliqués dans l'adhérence et la mobilité (cercle bleu) alors que d'autres sont sécrétés pour aider à la colonisation (cercle vert). Parmi eux certains sont régulés par les systèmes du Quorum sensing via la production d'homosérine lactones (HSL). (B) Les systèmes de Quorum Sensing de *P. aeruginosa*. Le système LasR/LasI (vert) produit l'inducteur 3-oxo-C12-HSL alors que le système RhIR/RhII (orange) produit le C4-HSL. Le troisième système de Quorum Sensing (cyan) utilise le PQS comme signal inducteur. L'inter-régulation entre ces trois systèmes est matérialisée par des flèches rouges.

2.1. Les facteurs liés à l'adhérence et à la mobilité

Comme d'autres Gram négatifs, le bacille pyocyanique présente à sa surface des structures qui participent à sa mobilité (mobilité de type « swarming » et mobilité de type « twitching » (Kohler, Curty *et al.* 2000) telles que le flagelle (Feldman, Bryan *et al.* 1998) ou les pili de type IV (Wall and Kaiser 1999). Ces structures sont entre autres responsables de l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires. Un nouveau facteur d'attachement a été récemment mis en évidence chez

P. aeruginosa. Il s'agit de *pili* de type *fimbriae* qui sont assemblés par la voie chaperonne « usher » (Vallet, Olson *et al.* 2001; Phan, Remaut *et al.* 2011).

La paroi extérieure de la membrane externe de *P. aeruginosa* est également tapissée de lipopolysaccharides (LPS). Ces LPS possèdent un rôle protecteur contre la lyse par le sérum, une activité endotoxique, ainsi qu'un rôle stimulateur de la réponse inflammatoire (Cryz, Pitt *et al.* 1984) entraînant une détérioration progressive de l'épithélium bronchique et donc une insuffisance respiratoire. Ils sont divisés en 3 parties : le lipide A ou endotoxine qui stimule excessivement le système immunitaire, le cœur oligosaccharidique, dont la variabilité est à l'origine du sérotype de *Pseudomonas aeruginosa*, et l'antigène O, qui définira le phénotype lisse ou rugueux en fonction de sa présence ou non sur le cœur oligosaccharidique.

2.2. Les facteurs impliqués dans la colonisation de l'hôte

2.2.1. Les facteurs dépendants du Quorum Sensing

Le quorum sensing est le mécanisme principal de régulation de la pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce système contribue à la perception de la densité cellulaire de la population bactérienne grâce à la production de phéromones diffusibles, les N-acyl-homosérine lactones (AHL). Lorsque leur concentration atteint un certain seuil, elles se lient au régulateur pour activer la transcription de gènes cibles, dits de virulence, représentant 6 à 10% du génome du bacille pyocyanique. A l'heure actuelle trois systèmes du quorum sensing ont été décrits chez *Pseudomonas aeruginosa* : LasR/LasI, RhlR/RhlI et le *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). Produit par LasI, l'autoinducteur du système Las est la N-(3-oxododecanoyl) homosérine lactone (3O-C₁₂-HSL), tandis que la N-butryl homosérine lactone (C₄-HSL) sert au système Rhl (Van Delden and Iglewski 1998; de Kievit and Iglewski 2000). Découvert plus récemment, et de structure différente des deux précédents, l'autoinducteur PQS est une 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (Pesci, Milbank *et al.* 1999; Dubern and Diggle 2008). Ces trois systèmes se régulent entre eux afin d'assurer un contrôle très fin des facteurs de virulence (Fig. 1B).

Les gènes contrôlés par le quorum sensing afin de coloniser l'hôte, codent pour différentes enzymes extracellulaires (exotoxines, élastases, phospholipases, protéases) ou interviennent dans la production de lipides ou des pigments pyocyaniques (Le Berre, Faure *et al.* 2006). Parmi tous ces facteurs on retrouve :

- L'exotoxine A, composé protéique le plus toxique produit par *P. aeruginosa*, inhibe la synthèse protéique des cellules cibles provoquant leur mort par nécrose (Wick, Frank *et al.* 1990).
- Les élastases LasA et LasB dégradent l'élastine (Galloway 1991) mais peuvent également inactiver d'autres constituants matriciels tels que le collagène et la fibrine ou encore s'attaquer au complément et à certaines cytokines (Hong and Ghebrehiwet 1992).
- Les phospholipases C: trois de ces enzymes extracellulaires thermolabiles ont été décrites chez *P. aeruginosa* avec chacune des spécificités de substrat différentes (Stonehouse, Cota-Gomez *et al.* 2002).
- Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires amphiphiles qui par leur pouvoir détergent vont perturber le mouvement mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium pulmonaire (Read, Roberts *et al.* 1992).
- La pyocyanine, pigment bleu sécrété par la bactérie, participe au stress oxydatif en oxydant le glutathion et en inactivant la catalase des cellules épithéliales respiratoires (O'Malley, Reszka *et al.* 2004).
- La pyoverdine est un sidérophore, une petite molécule qui chélate dans l'environnement le fer nécessaire au métabolisme de *Pseudomonas aeruginosa*. Le complexe ferri-sidérophore est transporté à l'intérieur du cytoplasme via un récepteur membranaire spécifique, FpvA. Par l'intermédiaire du facteur FpvR, la pyoverdine active le facteur PvdS qui joue un rôle clé de régulateur transcriptionnel du métabolisme ferrique. Par ailleurs la pyoverdine peut agir comme molécule de signalisation afin d'induire la sécrétion de certains facteurs de virulence tels l'exotoxine A et l'endoprotéase PrpL (ou protéase IV) (Meyer, Neely *et al.* 1996; Lamont, Beare *et al.* 2002).
- Les protéases : la protéase alcaline, sécrétée par le système de sécrétion de type I, dégrade la fibrine (Guzzo, Pages *et al.* 1991) alors que la protéase IV

exerce son pouvoir pathogène en dégradant les protéines de surfactant A, B et D (Malloy, Veldhuizen *et al.* 2005).

2.2.2. Les facteurs indépendants du Quorum Sensing

Le système de sécrétion de type III (SSTT) permet à la bactérie d'injecter directement les toxines à l'intérieur de la cellule et ainsi de résister à l'action bactéricide des neutrophiles humains en induisant leur mort cellulaire. Plusieurs toxines sont à présent connues pour être sécrétées via ce système : l'ExoS, l'ExoT, l'ExoU et l'ExoY (Shaver and Hauser 2004).

- L'exoenzyme S (ExoS): protéine bi fonctionnelle, elle possède tout d'abord une activité GAP spécifique des petites protéines de la famille Rho inhibant la mobilité et la phagocytose. D'autre part, son extrémité C-terminale lui confère une activité catalytique d'ADP-ribosyltransférase des protéines de la famille Ras. Le pouvoir pathogène de cette cytotoxine passe principalement par cette activité qui modifie l'organisation du cytosquelette et l'internalisation de *Pseudomonas aeruginosa* par les cellules épithéliales et les macrophages.
- L'exoenzyme T (ExoT): elle se différencie de l'ExoS notamment par une activité GAP spécifique de la GTPase *RhoA* et une activité catalytique d'ADP-ribosylation FAS-dépendante spécifique des protéines Crkl et Il (Sun and Barbieri 2003).
- L'exoenzyme U (ExoU) : la plus grande des cytotoxines sécrétée par SSTT possède une activité phospholipase A2 avec une large spécificité de substrats. Elle montre une cytotoxicité cent fois supérieure à ExoS et son activité lipolytique sur le dipalmitoyl phosphatidylcholine, surfactant pulmonaire, provoque une dissémination rapide des souches bactériennes dans le système sanguin (Sato, Frank *et al.* 2003; Sato, Feix *et al.* 2005).
- L'exoenzyme Y (ExoY) : c'est une adénylate cyclase responsable du changement de morphologie des cellules cibles qui deviennent arrondies suite à une augmentation intracellulaire du taux d'AMPc. Il en résulte une détérioration des cellules endothéliales pulmonaires due à la formation de pores intercellulaires (Yahr, Vallis *et al.* 1998).

Deux lectines solubles, d'une taille de 10 à 15kDa, ont quant à elles été décrites parmi les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie. PA-IL (ou LecA) présente une spécificité pour le galactose alors que PA-IIL (ou LecB) a une forte affinité pour le fucose (Imberty, wimmerova *et al.* 2004). Si ces deux lectines ne présentent pas d'identité de séquence, la présence de calcium dans le milieu reste impérative pour leur activité. Elles sont notamment impliquées dans la reconnaissance et l'adhésion bactérie-hôte et ont également la capacité d'inhiber le mouvement ciliaire de cellules pulmonaires *in vitro* (Adam, Mitchell *et al.* 1997). En 2009, Chemani, Imberty *et al.* ont pu montrer leur rôle dans l'induction de lésions pulmonaires aiguës (Chemani, Imberty *et al.* 2009).

Grâce à l'ensemble de ces stratégies immuno-évasives, *Pseudomonas aeruginosa* réussit à s'implanter chez son hôte et à outrepasser ses défenses innées ou acquises. Le développement de souches sous forme de biofilm (microcolonies enfouies dans une matrice exopolysaccharidique d'alginate) signera d'ailleurs l'installation durable des bactéries au sein des structures contaminées.

3. Les antibiotiques, outils pour lutter contre les infections bactériennes

Les antibiotiques sont des molécules capables de détruire les bactéries ou d'inhiber leur croissance et sont ainsi qualifiées respectivement de bactéricides ou bactériostatiques. Grand nombre d'entre elles sont des substances naturelles produites par les bactéries ou les champignons. En effet, les micro-organismes les utilisent afin de détruire leurs congénères concurrents au sein de leur biotope.

Le premier antibiotique découvert fut la pénicilline. D'abord identifiée par Ernest Duchesne au travers des vertus curatives de *Penicillium glaucum*, c'est Alexander Fleming qui décrira en 1929 ses propriétés antibiotiques. Dès lors, face à l'importance de cette avancée, d'autres antibiotiques furent recherchés et découverts à partir des microorganismes les plus divers (la Streptomycine à partir de l'actinobactérie *Streptomyces griseus*, la Néomycine à partir de *Streptomyces fradiae*, le Chloramphénicol de *Streptomyces venezuelae*, ...). Ils seront dès lors mis à profit pour lutter contre les maladies infectieuses (tuberculose, pneumonie, diphtérie, syphilis, tétanos...). Plus tard, le développement de la synthèse chimique permettra de diversifier les molécules à activité antibiotique en créant des molécules totalement nouvelles ou des molécules « héli-synthétiques » à partir des substances naturelles existantes.

On distingue ainsi aujourd'hui plus d'une dizaine de familles d'antibiotiques parmi lesquelles on peut citer les beta-lactamines (pénicillines et céphalosporines), les quinolones, les cyclines, les macrolides, les aminosides ou encore les phénicolés. Leur diversité structurale reflète entre autres des modes d'action différents. Ainsi trois cibles cellulaires majeures vont être visées par les antibiotiques (Fig. 2):

La paroi bactérienne: constituée d'une membrane lipidique associée au peptidoglycane, elle assure une certaine rigidité et protège la bactérie contre la pression osmotique. Les cibles principales des antibiotiques au niveau de ce constituant cellulaire sont principalement les enzymes de la synthèse du peptidoglycane. Les beta-lactamines inhibent ainsi les protéines liant la pénicilline (PBP pour *Penicillin Binding Proteins*) en bloquant irréversiblement leur activité de transpeptidation, de transglycosylation ou de carboxylation. Par ailleurs, les antibiotiques de la

- famille des polypeptides vont déséquilibrer la structure du lipopolysaccharide (LPS) situé à la surface des bactéries, interagir avec les phospholipides membranaires et former des pores au sein de la membrane cytoplasmique.
- La synthèse protéique: c'est ici un des constituants de la machinerie traductionnelle, le ribosome, qui est ciblé. La famille des Aminoglycosides a une action dirigée plus particulièrement vers la sous unité 30S du ribosome, alors que la sous unité 50S est la cible des macrolides et du chloramphénicol. Ces derniers sont peu utilisés contre *Pseudomonas aeruginosa* qui possède une résistance naturelle vis à vis de ces molécules de part la faible perméabilité de sa membrane cellulaire.
- La réplication et la réparation de l'ADN: mécanismes essentiels à la survie bactérienne, ils nécessitent notamment la présence de deux enzymes : l'ADN gyrase et la topoisomérase qui sont chargées de dérouler l'ADN en vue de sa réplication. Leur inhibition par la famille des quinolones entraîne des cassures excessives de l'ADN aboutissant à la mort cellulaire.

Enfin, d'autres antibiotiques agissent par inhibition compétitive lors de la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, un composé intervenant dans la biosynthèse des purines et pyrimidines. C'est le cas des sulfamides ou du triméthoprim mais une fois de plus, *Pseudomonas aeruginosa* est naturellement résistant à ces antibiotiques qui ne sont donc jamais utilisés contre ce pathogène.

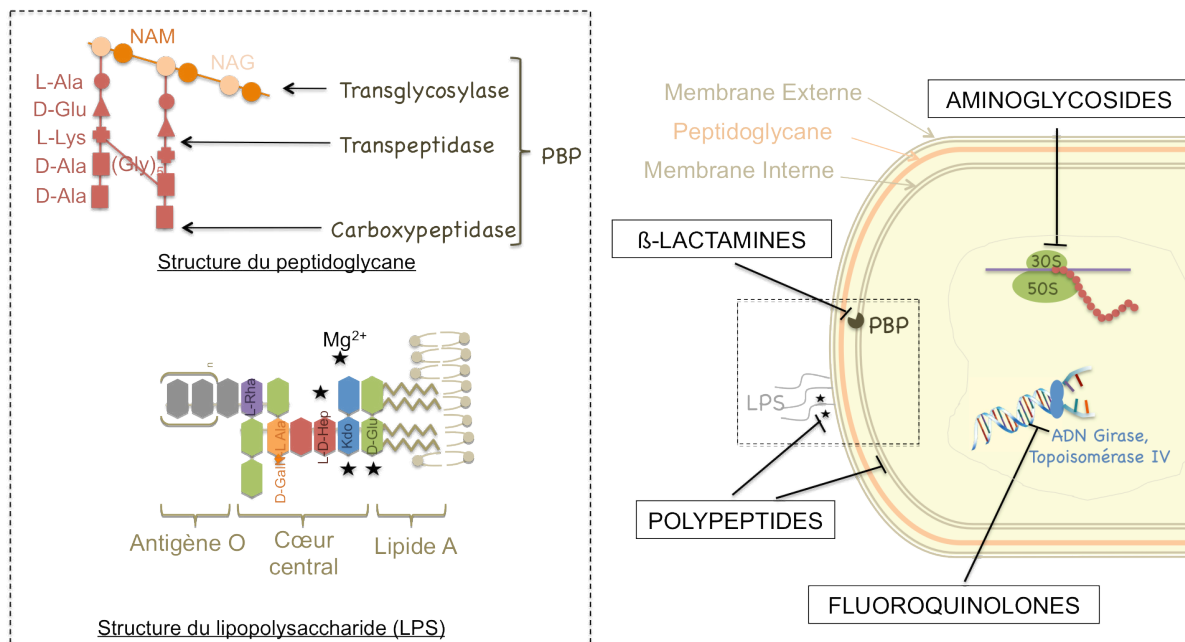


Fig. 2: Cibles principales des grandes classes d'antibiotiques utilisés contre *Pseudomonas aeruginosa*

Les beta-lactamines vont perturber la synthèse du peptidoglycane en inhibant l'activité de transpeptidation des protéines liant la pénicilline (PBP). Les polypeptides vont déstabiliser la structure du lipopolysaccharide (LPS) avant de former des trous au niveau de la membrane plasmique. Les aminosides agissent à l'intérieur de la cellule et inhibent la synthèse protéique en bloquant la sous unité 30S du ribosome. Enfin, les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN.

Cette diversité des antibiotiques et de leurs modes d'action semblait augurer la possibilité de venir à bout de la plupart des infections bactériennes mais c'était sans compter sur le problème majeur de résistances aux antibiotiques mis en place par les bactéries et notamment par *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa*

4.1. Résistance naturelle

Une des difficultés thérapeutique pour traiter les infections causées par *Pseudomonas aeruginosa* est liée à la résistance naturelle de ce pathogène à de nombreux antibiotiques. Il dispose en effet d'un arsenal de dispositifs qui vont limiter fortement l'efficacité des antibiotiques administrés.

4.1.1. Perméabilité membranaire

Si les antibiotiques utilisés contre les infections à *Pseudomonas aeruginosa* utilisent différents mécanismes d'action, ils doivent tous en premier lieu traverser la paroi cellulaire pour atteindre leur cible.

Toutes les bactéries à Gram négatif ont une membrane externe qui empêche naturellement le passage de molécules hydrophiles de poids moléculaire important. Celles ci doivent donc passer à travers des porines pour pénétrer dans les bactéries. Chez *Escherichia coli* OmpF assure ce transport tandis que chez *Pseudomonas aeruginosa* OprF est la principale porine. Malgré cette similitude, la membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* présente une perméabilité 10 à 100 fois plus faible que celle d'*Escherichia coli* [Nikaido & Hancock 1986]. Par reconstitution en protéoliposomes il a été montré que la diffusion de petits solutés monosaccharidiques tels que l'arabinose au travers d'OprF était 50 fois plus lente qu'avec OmpF (Yoshimura, Zalman *et al.* 1983). En revanche la porine du bacille pyocyanique permet le passage de solutés plus gros que ceux autorisés par OmpF (Hancock, Decad *et al.* 1979). Cette apparente contradiction entre faible perméabilité et canal large, peut, entre autres, s'expliquer par le fait qu'OprF est un homologue d'OmpA d'*E. coli*. La vitesse de diffusion des solutés au sein d'OmpA est de 2 ordres de grandeur plus faible que pour les porines classiques telles qu'OmpF (Sugawara and Nikaido 1992) et seul un faible pourcentage des protéines OmpA sont capables de former des canaux ouverts (Sugawara and Nikaido 1994). Des observations similaires ont été faites par la suite sur OprF par

ces mêmes auteurs qui démontrent ainsi que ces deux porines existent sous deux conformations :

- une conformation majoritaire fermée, organisée en deux domaines, un domaine N-terminal formant un tonneau membranaire de huit brins β et un domaine C-terminal globulaire et périplasmique. Cette forme peu perméable aux solutés est monomérique (Sugawara and Nikaido 1997).
- une conformation ouverte minoritaire qui s'organise en un seul domaine composé d'un plus grand nombre de brins β transmembranaires et adoptant un repliement similaire à OmpF (i.e. sous forme oligomérique) (Sugawara, Nestorovich *et al.* 2006). (Fig. 3)

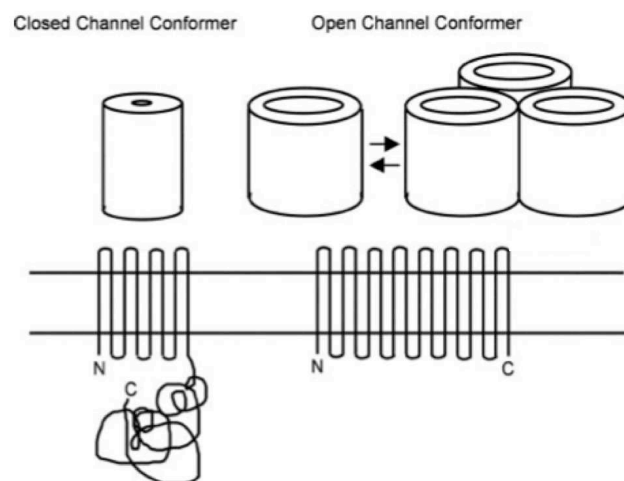


Fig. 3: Les deux états conformationnels de la porine OprF de *P. aeruginosa*
(Sugawara, Nestorovich *et al.* 2006)

On comprend ainsi qu'avec seulement 5% de forme ouverte, OprF, la porine non spécifique principale de *Pseudomonas aeruginosa* assure une barrière très peu perméable contrairement aux porines trimériques classiques de type OmpF. D'ailleurs, chez *E. coli* la contribution d'OmpA dans la perméabilité membranaire est négligeable. Finalement, la fonction majeure d'OmpA et OprF, sous leur conformation fermée, est de servir de lien entre membrane externe et peptidoglycane via leur domaine C-terminal. Ceci est d'autant plus crucial chez *Pseudomonas aeruginosa* qu'elle ne possède pas la lipoprotéine Braun qui joue

un rôle similaire chez *E. coli*. En effet, cette lipoprotéine assure normalement la cohésion de la paroi grâce à sa partie lipidique ancrée à la membrane par des liaisons hydrophobes et à sa partie polypeptidique associée au peptidoglycane par des liaisons covalentes.

4.1.2. Protection de la synthèse du peptidoglycane par les beta-lactamases

Un autre mécanisme de résistance naturelle se produit au niveau de la membrane externe des bactéries. Il s'agit ici pour la bactérie d'empêcher le blocage de la synthèse de sa paroi et plus particulièrement du peptidoglycane. Le peptidoglycane est composé d'une partie glucidique (alternance d'acide N-acétyl muramique « NAM » et de N-acétyl glucosamine « NAG ») et d'une partie peptidique composée de 5 acides aminés (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) et sa synthèse fait intervenir trois types d'enzymes appartenant à la famille des PBP: transglycosylase, transpeptidase et carboxypeptidase (Fig. 2). Une des stratégies de lutte contre les infections bactériennes a été le développement de molécules inhibitrices de ces enzymes, les beta-lactamines. Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* a trouvé un moyen de défense par la production de différentes beta-lactamases, enzymes dégradant le noyau lactame des beta-lactamines. Les antibiotiques ont une affinité plus grande pour ces protéases que pour les PBP. Lorsque les β -lactamases sont produites, les antibiotiques ne peuvent donc plus jouer leur rôle mimétique du dipeptide D-Ala-D-Ala auprès de la transpeptidase et la survie de la bactérie est ainsi assurée. Il existe différentes familles de beta-lactamases, dont le nom est lié à la famille d'antibiotique qu'elles inactivent: les céphalosporinases, qui hydrolysent principalement les céphalosporines de première génération, et les pénicillinases, qui ont pour substrat préférentiel les pénicillines.

4.1.2.1. La céphalosporinase inductible AmpC

Presque toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa* produisent une β -lactamase à large spectre appelée AmpC. Produite à un faible niveau basal, son expression est induite par certaines β -lactamines. La transcription du gène

ampC est contrôlée par le régulateur AmpR, dont le gène se situe juste en amont d'*ampC*. La transcription de ces deux gènes se déroule de manière divergente grâce à deux promoteurs chevauchants localisés dans la région intergénique. Deux protéines majeures interviennent dans la production d'AmpC : AmpG et AmpD. A chaque génération les bactéries vont partiellement re-fragmenter le peptidoglycane en « muropeptides » réutilisables pour une nouvelle synthèse. Lors de ce mécanisme de recyclage, AmpG, une perméase cytoplasmique, a pour rôle de transporter ces muropeptides recyclés de l'espace périplasmique vers le cytosol (Lindquist, Weston-Hafer *et al.* 1993) alors qu'AmpD, une N-acétyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase cytosolique est chargée de cliver la chaîne peptidique des muropeptides recyclés (Jacobs, Joris *et al.* 1995). Ainsi en l'absence d'induction, AmpR se lie sur la région promotrice entre *ampC* et *ampR* et inhibe la transcription des deux gènes (Fig. 4A). Lors du recyclage normal de la paroi, les acides N-acétyl muramiques-peptides (anhMurNAc) passent à travers AmpG pour atteindre le cytoplasme où ils seront à nouveau digérés par AmpD, et les tri-peptides libérés réutilisés comme précurseurs. Ce sont les penta-peptides AnhMurNAc non hydrolysés qui en se liant à AmpR vont induire la transcription d'*ampC* (Fig. 4B). Toutefois, tant qu'AmpD est suffisamment fonctionnel l'expression d'*ampC* reste à un faible niveau basal. Les peptides anhMurNAc jouent donc un rôle anti-répresseur sur l'expression de la céphalosporinase.

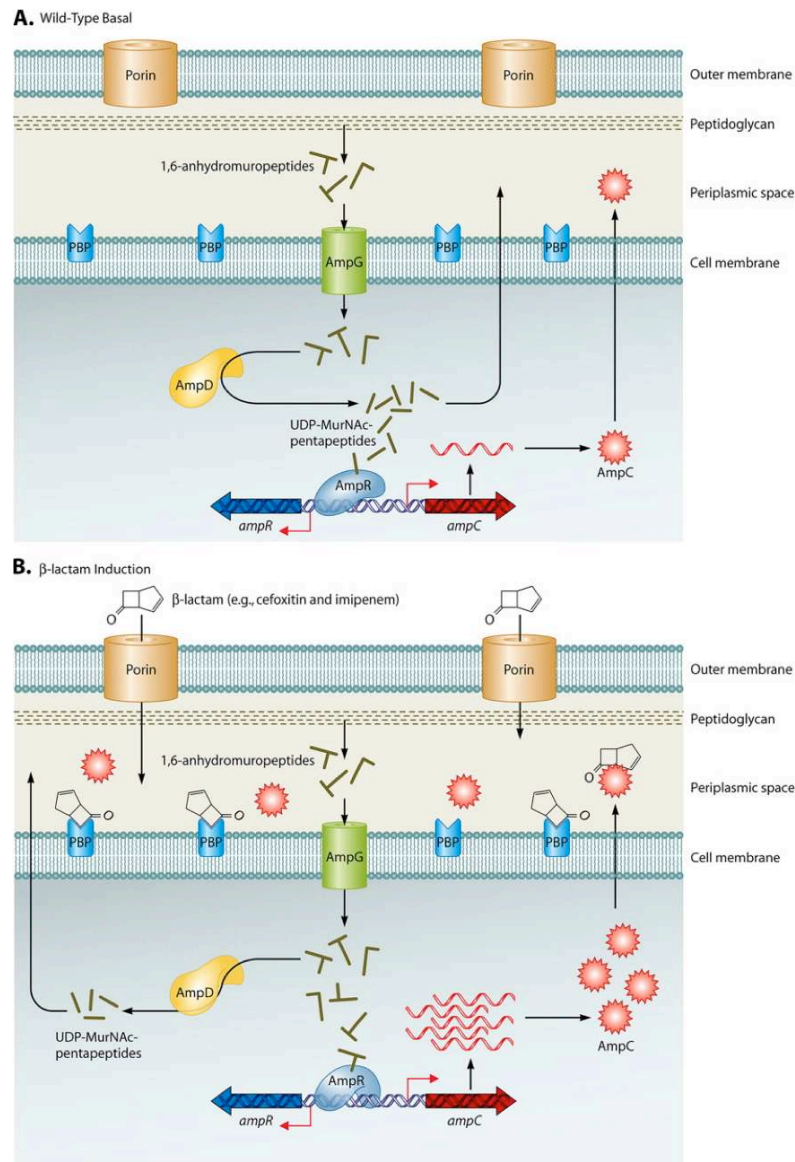


Fig. 4: Représentation schématique du système de régulation de l'expression de la céphalosporinase AmpC (Lister, Wolter et al. 2009)

(A) Niveau basal de l'expression d'AmpC : Les UDP-MurNAc, produits finaux du recyclage du peptidoglycane, interagissent avec AmpR qui, en se liant sur la région intergénique *ampR-ampC*, réprime la transcription d'AmpC. AmpC est ainsi produite à bas niveau dans l'espace périplasmique. (B) Les beta-lactamines se lient sur les protéines liant la pénicilline (PBP). Il en découle une accumulation de 1,6-anhydromuropeptides dans le périplasme qui vont interagir avec AmpR. Par un changement conformationnel celui ci va devenir activateur de la transcription d'AmpC. La céphalosporinase est alors exprimée à haut niveau dans le périplasme.

4.1.2.2. La pénicillinase oxacillinase PoxB

PoxB a été découverte « par hasard », lors d'une analyse de la susceptibilité d'une souche PAO1 délétée d'AmpC. Il s'est avéré que cette souche conservait une résistance aux β -lactamines de 50% par rapport à la souche PAO1 sauvage. Après analyse du génome de *Pseudomonas aeruginosa* il a été montré qu'il existait bien une seconde β -lactamase sur le locus PA5514. Le gène codant pour cette enzyme se trouve en amont d'un autre gène nommé *poxA*, qui présente une forte homologie avec une hydrolase. L'analyse réalisée par Kong, Jayawardena *et al.* (2005) a permis de montrer que ces deux gènes sont transcrits en opéron grâce à un promoteur σ^{70} mais que leur expression n'est pas induite par des molécules telles que la pénicillineG ou l'oxacilline. De plus, la répression de l'expression de *poxB* par AmpC a été validée par ces mêmes auteurs (Kong, Jayawardena *et al.* 2005). Elle est capable d'hydrolyser l'ampicilline, la céphaloridine, la céphalothine, la nitrocéfine, la pipéracilline et l'imipénème. Cette oxacillinase également nommée OXA-50, semble se différencier des autres oxacillinases connues puisqu'elle ne présente au mieux que 44% d'identité avec les β -lactamases OXA23 et OXA-27 d'*Acinetobacter baumannii*. De plus, elle a la particularité d'avoir une modification au sein d'un des motifs caractéristiques des β -lactamases de classe D (S-T-Y-K au lieu de S-T-F-K). Enfin, elle est inhibée efficacement par le NaCl mais très faiblement par l'acide clavulanique ou le tazobactame (Girlich, Naas *et al.* 2004). Malgré ses originalités, PoxB garde un rôle mineur dans la résistance naturelle chez *Pseudomonas aeruginosa* compte tenu de sa faible activité et de son spectre restreint.

4.1.3. Enzymes modificatrices des aminosides

Okii, lyobe *et al.* (1983) puis Hachler, Santanam *et al.* (1996) ont décrit sur le chromosome de *Pseudomonas aeruginosa* le gène *aphA* codant pour l'aminoglycoside 3'-Phosphotransferase IIb (APH(3')-IIb). Cette enzyme est capable de conférer une résistance naturelle au bacille pyocyanique, notamment vis à vis de la kanamycine et de la néomycine. *aphA* est situé en aval du gène *hpaA* codant pour un régulateur de type AraC. En présence d'acide 4-hydroxyphenylacétique (4-HPA), HpaA induit la transcription simultanée des deux gènes à l'origine de la résistance naturelle aux aminosides (Zeng and Jin 2003). Une caractérisation biochimique sur une forme recombinante d'APH(3')-IIb a permis de montrer que cette enzyme, contrairement aux autres APH(3'), phosphoryle spécifiquement la fonction hydroxyle C-3'-OH des aminosides. En outre, son action est faible sur l'amikacine et même nulle sur la tobramycine et la gentamicine (Hainrichson, Yaniv *et al.* 2007).

4.1.4. Systèmes d'efflux

Pseudomonas aeruginosa est capable de produire douze systèmes d'efflux actif différents (Fig. 5). Ces pompes appartiennent toutes à la famille RND (Resistance Nodulation cell Division) mais seules deux interviennent dans la résistance naturelle du bacille pyocyanique. MexAB-OprM dont l'expression est constitutive, génère une résistance aux beta-lactamines, aminosides, fluoroquinolones, tétracyclines, au triméthoprim et au chloramphénicol (Li, Nikaido *et al.* 1995). L'expression inductible par les antibiotiques de la pompe MexXY/OprM contribue à la résistance aux aminoglycosides (Aires, Kohler *et al.* 1999; Jeannot, Sobel *et al.* 2005). Ces systèmes utilisent pour leur fonctionnement, l'énergie de la membrane cytoplasmique en couplant l'efflux du substrat avec l'entrée de protons.

Systèmes d'efflux	Principaux antibiotiques substrats
MexAB-OprM	β -lactamines, fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol, tétracycline, novobiocine, érythromycine, sulfamides, acide fusidique, tigécycline...
MexXY/OprM	<u>aminoglycosides</u> , fluoroquinolones, céfépime, cefpirome, tétracycline, érythromycine, tigécycline...
MexCD-OprJ	tétracycline, tigécycline, fluoroquinolones, érythromycine, chloramphénicol, céfépime, ceftazidime, cefpirome, triméthoprim...
MexEF-OprN	fluoroquinolones, tétracycline, chloramphénicol, triméthoprim, érythromycine...
MexJK/OprM (OprH)	tétracyclines, érythromycine...
MexGHI-OpmD	fluoroquinolones, tétracycline...
MexMN/OprM	fluoroquinolones, chloramphénicol, tétracycline, érythromycine...
MexPQ-OmpE	fluoroquinolones, chloramphénicol, tétracycline, érythromycine
MuxABC-OpmB	aztréonam, tétracycline, érythromycine, novobiocine...
MexVW/OprM	fluoroquinolones, chloramphénicol, tétracycline, érythromycine...

Fig. 5 : Tableau des principaux antibiotiques substrats des systèmes d'efflux actifs de *Pseudomonas aeruginosa*

Tous ces processus complexes agissent simultanément et visent à inactiver les antibiotiques ou à les empêcher d'atteindre leur cible intracellulaire, ils concourent donc à la résistance naturelle de *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant la résistance du bacille pyocyanique va atteindre un niveau de complexité supérieur grâce aux diverses mutations qu'il est capable d'acquérir.

4.2. Résistance acquise

L'émergence de mutants résistants sous traitement est fréquemment observée dans les infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Ces mutations apparaissent avec une fréquence qui peut aller de 10^{-9} à 10^{-5} et confèrent une résistance dite « stable » vis-à-vis d'un nombre plus ou moins important d'antibiotiques selon le mécanisme mis en cause. On distingue les mécanismes à déterminisme génétique, transmissibles à la descendance dont l'expression peut être induite suite à l'exposition aux antibiotiques (enzymes, efflux actif), des mécanismes qualifiés de

« phénotypiques » qui dépendent plutôt de l'influence de l'environnement dans lequel se développe la bactérie.

4.2.1. Surproduction enzymatique

Sous l'effet de mutations spontanées, la céphalosporinase AmpC peut être surproduite de 20 à 500 fois. Ces mutations touchent principalement le gène *ampD* (Langae, Gagnon *et al.* 2000). Il en résulte une liaison continue des peptides anhMurNAc sur AmpR qui va donc activer en permanence la transcription d'*ampC*. Contrairement aux Entérobactéries, la levée de répression sur AmpC n'est que partielle, ce qui a pour conséquence un maintien des capacités d'inductibilité même si le niveau d'expression de la forme non induite de l'enzyme est supérieur. Ces mutations surviennent avec une fréquence de 10^{-7} à 10^{-9} (Livermore 1995). La ticarcilline, pipéracilline et certaines céphalosporines ont permis de mettre en évidence de telles mutations en milieu clinique dans le cadre d'infections au bacille pyocyanique (Shannon, King *et al.* 1982; Livermore 1987).

4.2.2. Surproduction des systèmes d'efflux

L'expression des systèmes d'efflux est hautement régulée. La surexpression des pompes d'efflux est en fait la conséquence de l'exposition aux agents antimicrobiens aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et cette surexpression résulte principalement de mutations sur des gènes codant pour des protéines régulatrices. Ces gènes sont généralement localisés juste en amont des opérons codant pour les systèmes d'efflux (Fig. 6). Ces mutations sont stables puisque l'expression persiste longtemps après l'arrêt de la pression de sélection. Seul le système MexXY semble être inductible par la présence d'antibiotiques (Masuda, Sakagawa *et al.* 2000). MexCD-OprJ par exemple n'est pas induit par ses antibiotiques substrats mais par différents agents désinfectants utilisés en milieu hospitalier (chlorure de benzalkonium, ou la chlorhexidine gluconate) (Morita, Murata *et al.* 2003).

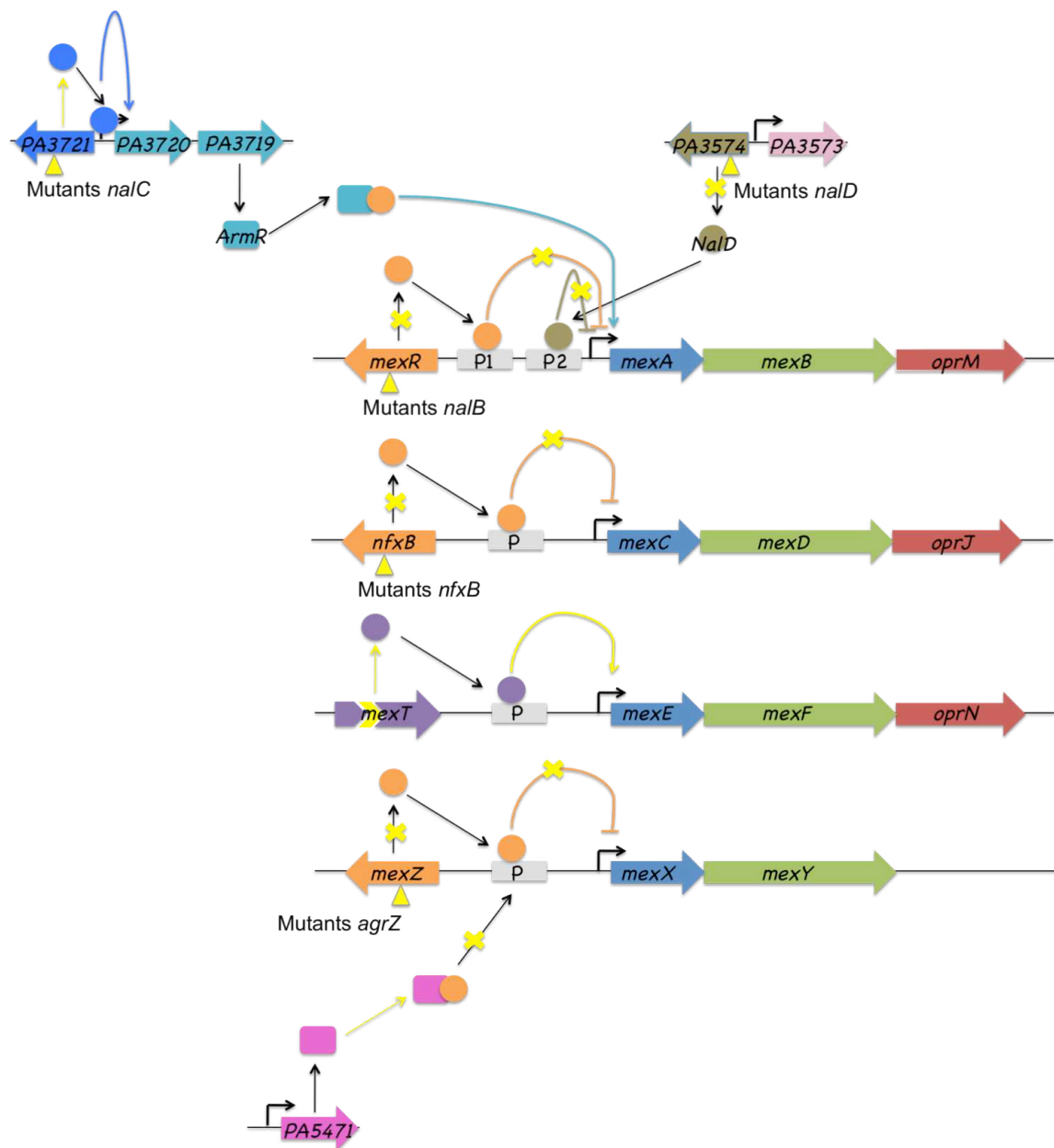


Fig. 6: Représentation schématique des systèmes de régulation impliqués dans la surexpression des pompes d'efflux de *Pseudomonas aeruginosa*

Le premier gène (en bleu) code pour la protéine adaptatrice, le second (en vert) pour le transporteur RND et le dernier (en rouge) code pour la protéine de la membrane externe. Les régulateurs négatifs directs sont représentés en orange et les positifs en violet. Les régulateurs indirects sont représentés sur des opérons indépendants. Les mutants cliniques des régulateurs des pompes d'efflux sont indiqués par un triangle jaune.

La protéine régulatrice de type *mex* la mieux caractérisée est MexR, le régulateur de la pompe MexAB-OprM, appartenant à la famille des régulateurs MarR

(Sulavik, Gambino *et al.* 1995). Il se lie sous forme d'un dimère dans la région intragénique *mexR-mexA* (Saito, Eda *et al.* 2001). Si l'opéron *mexAB-oprM* est toujours transcrit à bas niveau, sa surproduction résulte de mutants de *mexR* (Saito, Yoneyama *et al.* 1999; Adewoye, Sutherland *et al.* 2002). La surexpression de ce système d'efflux a été initialement décrite via la résistance à l'acide nalidixique sous le terme de "*nalB* mutation" (Rella and Haas 1982) mais il s'est avéré que ce type de mutations correspondait à des mutations dans la région en amont des gènes *mexAB-oprM* c'est-à-dire sur *mexR*. Un autre type de mutations dénommé "*nalC* mutation" a été décrit (Srikumar, Paul *et al.* 2000). Ces mutations affectent le gène PA3721 prédit comme régulateur de type TetR et induisent une surexpression des gènes PA3720-PA3719 situés juste en aval (Cao, Srikumar *et al.* 2004). PA3719 code pour ArmR, un antirépresseur de *mexR* (Daigle, Cao *et al.* 2007), qui en se liant sur MexR va favoriser la surexpression de *mexAB-oprM*. Des composés chimiques contenant une chaîne chlorophénol tels que le triclosan semblent induire ce type de mutations *nalC* (Ghosh, Cremers *et al.* 2011). Un troisième système vient réguler la surexpression de MexAB-OprM. Il s'agit des mutants *nalD* qui affectent le gène PA3574 codant pour un répresseur de type TetR (Sobel, Hocquet *et al.* 2005). NalD se fixe sur un deuxième promoteur situé en amont de l'opéron *mexAB-oprM* mais en aval du promoteur reconnu par MexR. Ce promoteur lui est spécifique mais l'efficacité de NalD semble être augmentée lorsque MexR est également lié à son promoteur (Morita, Cao *et al.* 2006).

nfxB (Okazaki and Hirai 1992; Shiba, Ishiguro *et al.* 1995; Poole, Gotoh *et al.* 1996) et *mexZ* (Westbrock-Wadman, Sherman *et al.* 1999; Matsuo, Eda *et al.* 2004) codent quant à eux pour des régulateurs négatifs dont les mutations vont causer la surexpression des pompes MexCD-OprJ et MexXY respectivement. MexZ est un régulateur de la famille TetR et les mutations associées sont nommées mutations *agrZ*. De plus, l'interaction du produit du gène PA5471 avec MexZ empêcherait sa liaison sur la région intergénique *mexZ-mexX* expliquant la surexpression de la pompe MexXY (Yamamoto, Ueda *et al.* 2009). L'opéron *mexEF-oprN* est en revanche régulé positivement par le produit du gène *mexT*, codant pour un activateur de la famille LysR (Kohler, Epp *et al.* 1999). La plupart

des souches sauvages de *Pseudomonas aeruginosa* présentent donc des mutations de *mexT* afin d'éviter la surexpression de la pompe MexEF-OprN. C'est la réversion de ces mutations ou l'apparition de mutations suppresseurs qui induisent cette régulation positive (Maseda, Saito *et al.* 2000; Kohler, van Delden *et al.* 2001). Classiquement, ce sont les mutations de type *nfxC* qui correspondent à la surexpression de MexEF-OprN associée à une inhibition d'OprD.

4.2.3. Biofilm

Il s'agit ici d'un mode de vie particulier correspondant à un mécanisme adaptatif complexe et transitoire, indépendant de mutations. Ce phénomène est difficilement identifiable sur un antibiogramme classique et expliquerait la mauvaise réponse thérapeutique de certains patients atteints de la mucoviscidose. Pour former ces biofilms, les bactéries individuelles doivent d'abord adhérer au tissu atteint via leur flagelle puis former une monocouche où viendront ensuite s'attacher d'autres bactéries. Ces structures sont enfin enveloppées dans une matrice exopolysaccharidique. Ainsi, en délaissant leur comportement cellulaire individuel, ces communautés bactériennes denses deviennent beaucoup plus résistantes aux antibiotiques qu'elles ne le seraient à l'état planctonique (Aaron, Ferris *et al.* 2002). Une des caractéristiques principales des biofilms est l'hétérogénéité cellulaire qui y règne. En effet, les cellules localisées à la périphérie du biofilm ont un meilleur accès aux nutriments et à l'oxygène et sont considérées comme métaboliquement plus actives que leurs congénères situées au centre du biofilm. Ce seront donc les seules qui seront potentiellement sensibles aux antibiotiques. De plus, des modifications dans le métabolisme carboné sont observées ainsi que l'induction de protéines impliquées dans le stress oxydatif, illustrant le passage à des processus anaérobies. Il semblerait donc que la limitation en oxygène, qui réduit l'activité métabolique à la surface du biofilm, soit le principal mécanisme expliquant la faible activité des antibiotiques sur *Pseudomonas aeruginosa* lorsqu'il adopte ce mode de vie (Walters, Roe *et al.* 2003).

4.2.4. Acquisition de matériel génétique étranger

L'apparition de nouvelles résistances aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* est également liée à l'acquisition de matériel génétique étranger de type plasmide, transposon ou intégron (Coyne, Courvalin *et al.* 2010). Ils peuvent être récupérés d'autres bactéries à Gram négatif mais aussi à Gram positif comme pour les gènes codant pour des méthylases de l'ARN 16S.

5. La résistance aux antibiotiques par classe

Comme cela a été décrit dans le chapitre 3, chaque famille d'antibiotiques agit sur des cibles spécifiques. Les mécanismes de résistance développés par *Pseudomonas aeruginosa* pour lutter contre ces antibiotiques vont donc être différents selon la famille concernée. Il apparaît donc judicieux à présent de présenter une description de ces mécanismes et des différents protagonistes impliqués, par classe d'antibiotiques. Dans certain cas, il existe même une « signature de résistance » permettant de mettre en évidence la nature du mécanisme activé par la lecture d'antibiogrammes ; certains exemples seront illustrés ici et pourront être comparés au profil de la souche sauvage ci dessous (Fig. 7).

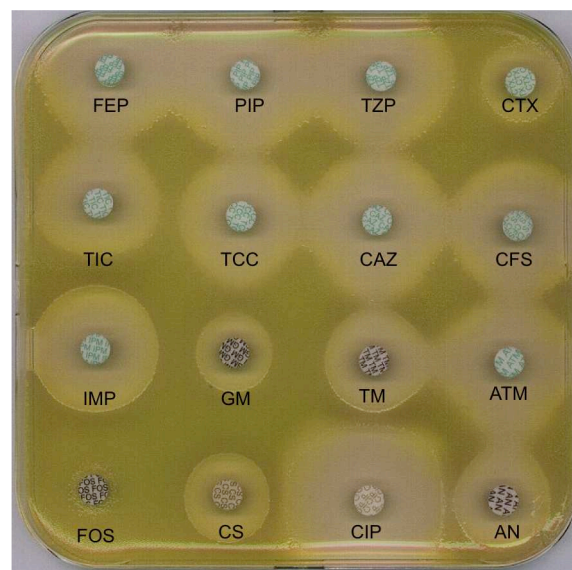


Fig. 7: Antibiogramme de la souche PAO1 sauvage

5.1. Beta-lactamines, déstabilisation de la paroi bactérienne

5.1.1. Une famille d'antibiotique complexe : structure générale, nomenclature et propriétés

Cette vaste famille regroupe toutes les molécules comportant un noyau β -lactame composé de trois carbones et un atome d'azote. Leur classification dépend ensuite de la structure du noyau associé au noyau β -lactame (Fig. 8) :

- Pénicillines → noyau Thiazolidine
 - carboxypénicilline : Ticarcilline (TIC)
 - uréidopénicilline : Pipéracilline (PIP)
- Carbapénèmes → noyau 2,3-dihydro-1H-pyrrole
 - Imipénème (IMP)
 - Méropénème (MEM)
- Céphalosporines → noyau 3,6 dihydro-2H-1,3-thiazine
 - 3^{ème} génération : Ceftazidime (CAZ), Cefsulodine (CFS)
 - 4^{ème} génération : Céfépime (FEP)
- Monobactames → pas de noyau supplémentaire
 - Aztréonam (ATM)

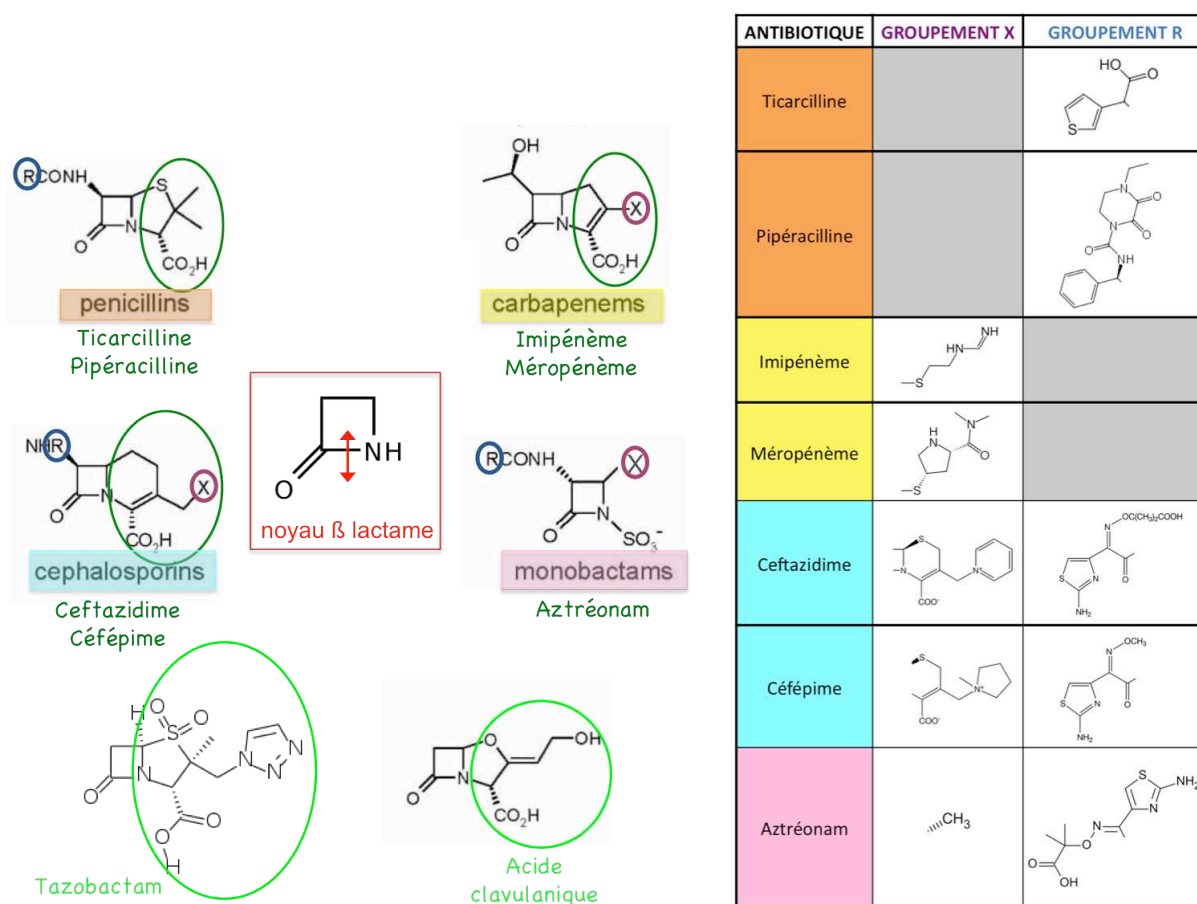


Fig. 8: Les différentes classes de β -lactamines

Le noyau β -lactame est commun à toutes les beta-lactamines. Sur la structure de chaque classe de beta lactamines est indiquée par un cercle vert le noyau représentatif de la classe considérée. Au sein de chaque classe on distingue ensuite différentes molécules qui se différencient par les groupements R (cercle bleu) et/ou X (cercle violet) dont la formule développée est décrite dans le tableau. Des exemples de molécules sont écrits en vert. Deux molécules sont indiquées en vert clair, elles correspondent à des inhibiteurs de beta-lactamases, utilisés en synergie avec les pénicillines. La flèche rouge sur le noyau β -lactame indique le site de coupure par les beta-lactamases.

Ce sont les antibiotiques les plus utilisés en thérapeutique en raison de leur large spectre d'activité et de leur action bactéricide rapide. En effet ces molécules agissent en inhibant la synthèse du peptidoglycane car ce sont des analogues de la D-alanyl-D-alanine, l'acide aminé terminal du précurseur peptidique du peptidoglycane. Cette similarité structurale leur permet ainsi de se lier de manière irréversible sur le site actif des protéines liant la pénicilline (PBP pour « penicillins

binding proteins ») qui ne peuvent alors plus réaliser l'étape finale de transpeptidation nécessaire à la synthèse de la paroi cellulaire.

La résistance aux β -lactamines implique en premier lieu l'expression de β -lactamases. Ces enzymes sont réparties en quatre classes (A à D) selon la classification d'Ambler (Ambler 1980; Hall and Barlow 2005). Cette classification repose sur les analogies des séquences peptidiques au niveau du site enzymatique ainsi que sur le profil d'inhibition. Elles hydrolysent toutes le noyau β -lactame mais les enzymes de classe A, C et D possèdent une sérine dans le site catalytique alors que celles de classe B sont actives en présence de zinc. Plus de 800 β -lactamases ont été décrites chez les bacilles à Gram négatif (Jacoby and Bush 2005) et au moins 120 ont été retrouvées chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa* (Zhao and Hu 2010).

Beta Lactamases		ATB affectés	ATB toujours efficaces	Efficacité des inhibiteurs
Céphalosporinase AmpC		TIC, TCC, PIP, TZP(s/R), CAZ(s/R) FEP(S/R), ATM(R/I)	IMP, MEM, FEP(S/R)	NON
beta lactamases de classe A	Pénicillinase PSE-1 (CARB-2) PSE-4 (CARB-1) PSE 3 et 5 CARB-3 et 4	TIC, PIP	CAZ, ATM, IMP, MEM, FEP(S/R)	OUI (ac. Cla. et tazo.)
	BLSE PER-1 TEM (1, 2, 4, 21, 24, 42, 45) SHV (2a, 5, 12) CTX-M VEB (1a, 1b, 2, 3) BEL-1 GES (1, 8, 9)	TIC, CAZ, FEP, PIP(S/R), TCC (s/R)	IMP, MEM, PIP(S/R), TZP(S/R)	OUI (ac. Cla.)
beta lactamases de classe D	Oxacillinase à Spectre restreint OXA-1 OXA-2 OXA-10 (PSE-2)	TIC, TCC	TZP, CAZ, AZM, IMP, MEM, PIP(S/R), FEP(S/R)	OUI (ac. Cla. et tazo.)
	à Spectre Etendu OXA (11, 14, 16, 17, 19, 28) OXA-18 et 45	TIC, TCC, CAZ	ATM(S/I), FEP(S/R), PIP(S/R), TZP(S/R), IMP, MEM	NON --- OUI (ac. Cla. et tazo.) ---
beta lactamases de classe B	IMP (1, 2, 4 ...18) VIM (1,2 ...13) SPM-1 GIM-1 NDM-1	TIC, TCC, CAZ, FEP, PIP(s/R), TZP(s/R), IMP(i/R), MEM(i/R)	ATM(S/I)	OUI (EDTA) NON (ac. Cla.)

Fig. 9: Les différentes classes de beta lactamases participant à la résistance acquise de *Pseudomonas aeruginosa*

5.1.2. Surproduction de la céphalosporinase AmpC

Pseudomonas aeruginosa est naturellement susceptible aux carboxypénicillines, à la ceftazidime et à l'aztréonam, cependant il peut acquérir une résistance aux céphalosporines de troisième génération grâce à l'hyperproduction de sa céphalosporinase naturelle, AmpC (Bagge, Ciofu et al. 2002). Cette enzyme faiblement exprimée à l'état basal peut voir son expression partiellement ou totalement déreprimée par diverses mutations. Celles ci touchent notamment la

protéine AmpD intervenant dans la dégradation des peptides AnhMurNAc lors du recyclage du peptidoglycane. La conséquence de cette surproduction va être l'hydrolyse de la majorité des β -lactamines à l'exception des carbapénèmes. Cependant certaines différences existent entre les antibiotiques, permettant le dépistage de ces souches surproductrices d'AmpC afin de prescrire le traitement anti-infectieux adéquat. Par exemple, le céfépime résistant mieux à l'inactivation que la ceftazidime, la surproduction d'AmpC peut être décelée sur un antibiogramme par un diamètre d'inhibition inférieur pour la céfépime que pour la ceftazidime. Par ailleurs, cette β -lactamase comme toutes celles de classe C, est sensible à de fortes concentrations de cloxacilline ou d'oxacilline (pénicillines à spectre étroit). Ainsi une souche surproductrice d'AmpC redeviendra sensible aux β -lactamines lorsqu'elle sera étalée sur un milieu gélosé contenant 1000 mg/L de cloxacilline (Fig. 10).

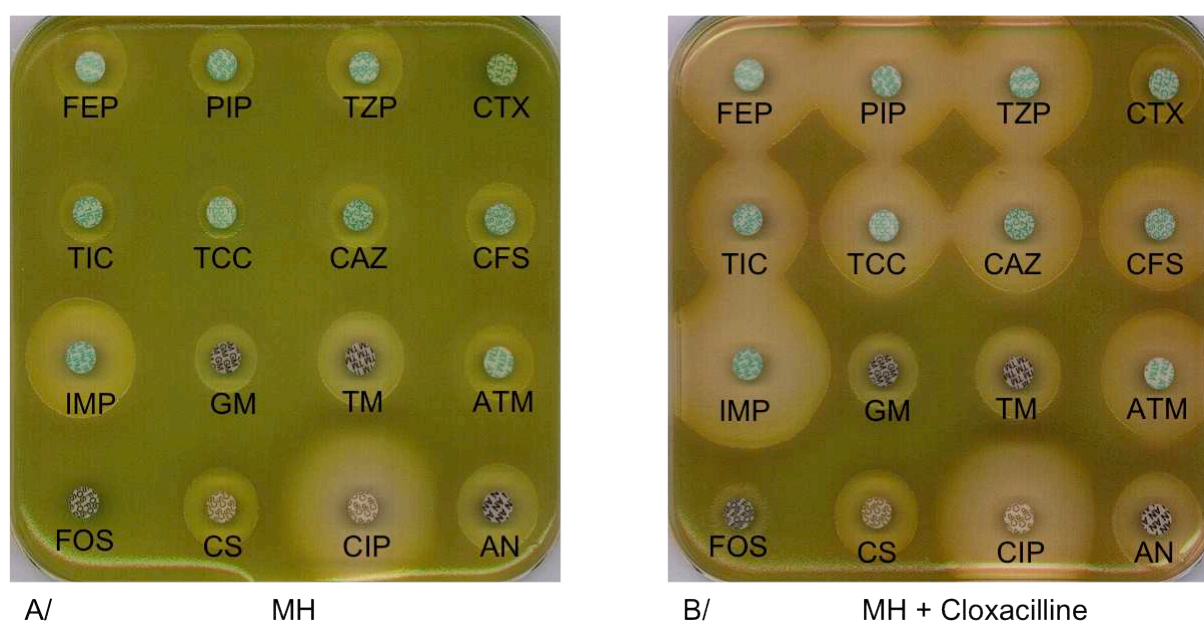


Fig. 10: AntibioGrammes d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* surexprimant la céphalosporinase AmpC (Source : <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr>)

En (A), la souche étalée sur milieu Mueller Hinton (MH) est résistante aux principales β -lactamines grâce à la surproduction d'AmpC mais la réversion de ce phénotype en phénotype « sauvage » lorsque la souche est étalée sur un milieu MH contenant de la Cloxacilline (B/) est caractéristique de ce type de mutation.

Les mutants stables surproducteurs d'AmpC deviennent résistants à la ticarcilline, la pipéracilline et aux céphalosporines de troisième génération (Livermore 1987) mais AmpC est insensible aux inhibiteurs des β -lactamases utilisés classiquement en milieu clinique tels que l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam (Nordmann and Guibert 1998).

En France la surproduction de cette enzyme est le principal mécanisme de résistance à la ceftazidime retrouvé dans les isolats cliniques (Cavallo, Leblanc *et al.* 2000). Toutefois, contrairement aux entérobactéries, le gène *ampC* n'a jamais été retrouvé, à ce jour, sur des plasmides.

5.1.3. Résistance par production de β -lactamases de classe A

5.1.3.1. Pénicillinases

Parmi les pénicillinases on en distingue certaines spécifiques de *Pseudomonas* identifiées sous le nom de PSE-1 (« *Pseudomonas* specific enzyme ») ou CARB-2, PSE-4 (CARB-1), PSE-3 à 5, CARB-3 et CARB-4 (Takahashi, Tsukamoto *et al.* 1983; Boissinot and Levesque 1990; Huovinen and Jacoby 1991; Lachapelle, Dufresne *et al.* 1991; Sanschagrin, Bejaoui *et al.* 1998). PSE-1, PSE-4 et CARB-3 ne diffèrent que d'un ou deux acides aminés alors qu'elles ne possèdent que 86,3% d'homologie avec CARB-4 dont le gène semble avoir été acquis via d'autres bactéries eu égard son faible pourcentage en GC (39,1% au lieu de 67% en moyenne). Elles sont actives contre les carboxypénicillines, les uréidopénicillines et la cefsulodine mais inefficaces vis-à-vis des céphalosporines, des carbapénèmes ou de l'aztréonam. Elles sont inactivées par les inhibiteurs classiques des β -lactamases. Ainsi dans une visée diagnostique et thérapeutique, des diamètres d'inhibition autour de disques TTC et TZP plus importants qu'autour des disques TIC et PIP iront en faveur d'une souche sur-exprimant une ou plusieurs pénicillinases (Fig. 11).

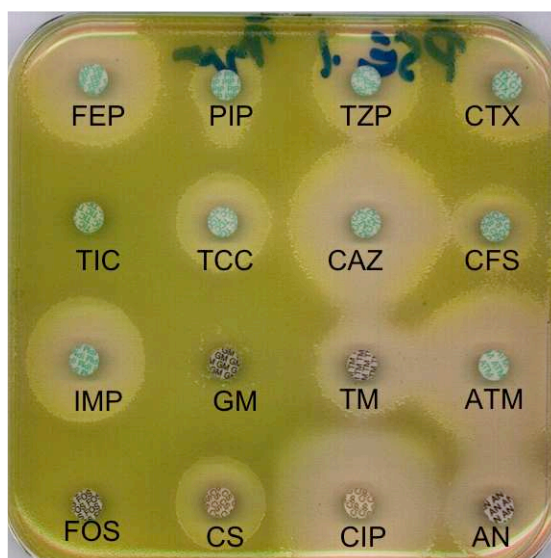


Fig. 11: Antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* exprimant la pénicillinase PSE-1 (Source : <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr>)

A noter : Une résistance à la Ticarcilline (TIC) et à la Pipéracilline (PIP) mais une sensibilité aux inhibiteurs de beta-lactamases visible par des diamètres d'inhibition plus importants pour les disques TTC et TZP.

5.1.3.2. β -lactamases à spectre étendu

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) hydrolysent non seulement les carboxypénicillines et les uréidopénicillines mais aussi les céphalosporines (ceftazidime, céfépime) (Weldhagen, Poirel *et al.* 2003). PER-1 (*Pseudomonas* Extended Resistance) a été la première enzyme de cette classe à être décrite en 1991 en France chez un patient originaire de Turquie. Depuis, six autres familles ont été identifiées chez *Pseudomonas aeruginosa* : TEM, SHV (toutes deux bien caractérisées chez les Entérobactéries), CTX-M, VEB (Vietnamese Extended spectrum β -lactamase), GES/IBC (Guiana Extended Spectrum) et BEL (Belgium). Différents variants ont été décrits dans différentes parties du globe (Strateva and Yordanov 2009). En France, plusieurs souches de TEM ont été isolées dans les années 1990 : TEM-42 (Mugnier, Dubrous *et al.* 1996), TEM-4 (Poirel, Ronco *et al.* 1999), TEM-21 (Dubois, Arpin *et al.* 2002) et TEM-24 (Marchandin, Jean-Pierre *et al.* 2000). SHV-2a a été détectée en 1995 en France et à l'heure actuelle ce sont les types PER et GES qui sont les plus fréquemment rencontrés. Ils sont d'ailleurs à l'origine d'épidémies hospitalières (De Champs, Chanal *et al.* 2004; Hocquet, Plesiat *et al.* 2010).

Leur activité est inhibée *in vitro* par l'acide clavulanique (Nordmann and Guibert 1998) ce qui permet de les détecter rapidement en routine par un test de synergie entre un disque de ceftazidime et un disque contenant de l'acide clavulanique. En effet, on observe dans ce cas une asymétrie de la zone d'inhibition autour des disques d'antibiotiques avec une sensibilité à la ceftazidime uniquement au voisinage du disque d'acide clavulanique (Fig. 12).

Ces gènes de classe A des BLSE sont les principaux responsables de la diffusion de la résistance aux antibiotiques, réduisant les possibilités de traitement des infections par le bacille pyocyane.

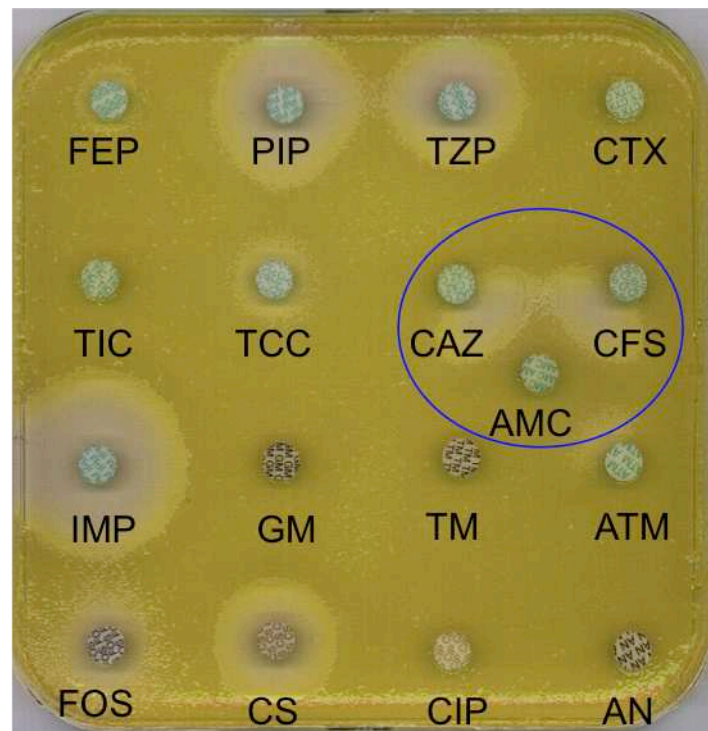


Fig. 12: Antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* exprimant la BLSE PER-1 (Source : <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr>)

A noter, encerclé en bleu : La synergie des céphalosporines de 3^{ème} génération (CAZ et CFS) avec l'acide clavulanique (AMC).

5.1.4. Résistance par production de β -lactamases de classe D

Les β -lactamases de classe D sont appelées « oxacillinases à spectre élargi » (ES-OXA) (Poirel, Naas *et al.* 2010). La majorité de ces BLSE dérivent d'« oxacillinases à spectre restreint » par des mutations ponctuelles. En 1995, Sanschagrín a décrit cinq groupes (notés de I à V) d'oxacillinases (Fig. 13) (Sanschagrín, Couture *et al.* 1995).

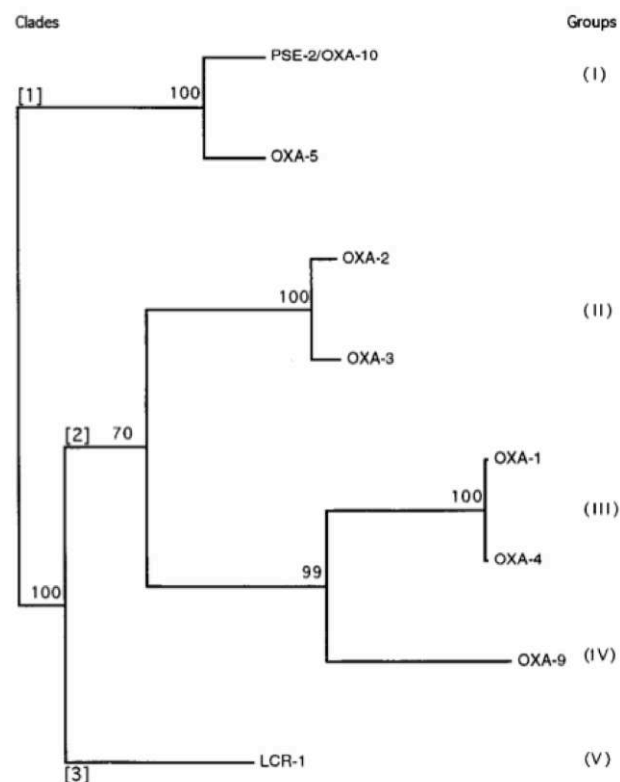


Fig. 13: Dendrogramme représentant les 5 groupes de β -lactamases de classe D (Sanschagrín, Couture *et al.* 1995)

OXA-1, OXA-2, OXA-10, oxacillinasés dites « classiques », sont actives contre les carboxypénicillines et les uréidopénicillines mais inefficaces sur la ceftazidime (Bert, Branger *et al.* 2002) (Fig. 14). Les oxacillinasés hydrolysant la ceftazidime ont un spectre d'action incluant le céfotaxime, la céfépime ou l'aztréonam (Bradford 2001). Hormis OXA-18 et OXA-45, toutes ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam (Philippon, Naas *et al.* 1997). Leur détection en routine est donc difficile et le diagnostic se fait souvent par élimination. Des réactions de PCR sont nécessaires pour détecter et identifier après séquençage, les gènes codant pour ces β -lactamases. La plupart des oxacillinasés à spectre étendu sont présentes sur des plasmides ou des intégrons, ce qui explique leur prévalence en Europe.

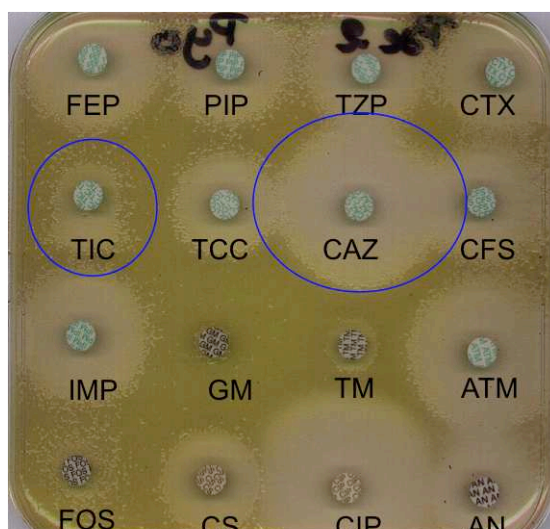


Fig. 14: Antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* exprimant l'oxacillase OXA-10 (Source : <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr>)

A noter, encerclés en bleu : L'action de l'oxacillase sur la Ticarcilline (TIC) mais son inefficacité sur la Ceftazidime (CAZ).

5.1.5. Résistance par production de β -lactamases de classe B

Ces enzymes sont également connues sous le nom de carbapénémases ou de métallob- β -lactamases en raison de la présence d'un ou deux atome(s) de zinc dans leur site actif. Elles agissent sur une grande variété de β -lactamines à l'exception de l'aztréonam et parfois de la pipéracilline. Six groupes ont été décrits chez *Pseudomonas aeruginosa* : IMP (active sur l'Imipénème), VIM (Verona-

Integron-encoded Metallo- β -lactamases), SPM (Sao Paulo Metallo- β -lactamases), AIM (Australia Imipenemase), GIM (German Imipenemase) et NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamases) (Toleman, Simm *et al.* 2002; Castanheira, Toleman *et al.* 2004; Koh, Wang *et al.* 2004; Giske, Libisch *et al.* 2006; Hanson, Hossain *et al.* 2006). L'activité de ces métallob-lactamases n'est pas inhibée par l'acide clavulanique mais par des chélateurs d'ions divalents tels que l'EDTA (Nordmann and Poirel 2002). La recherche de métallob-lactamases est justifiée devant une souche résistante à la ceftazidime et à l'imipénème. Le test d'identification, sensible et spécifique, utilisé en routine consiste donc en l'observation d'une synergie entre un disque de carbapénème et un disque contenant de l'EDTA (Qu, Zhang *et al.* 2009).

Aux vues de ces quelques données, il apparaît indéniable que l'émergence de souches de *P. aeruginosa* produisant des β -lactamases à spectre élargi (de type PER, OXA, SHV, TEM, GES, VEB) ou/et des carbapénémases (de type VIM, IMP, GES) représente aujourd'hui un véritable problème de santé publique. C'est pourquoi dès lors qu'une résistance à la ceftazidime est détectée, le Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques (CNR de la résistance aux antibiotiques) peut prendre en charge l'analyse de ces souches multirésistantes afin d'évaluer leur risque épidémique. La figure 15 présente le protocole défini par le CNR qui résume les indications diagnostiques détaillées dans les paragraphes précédents.

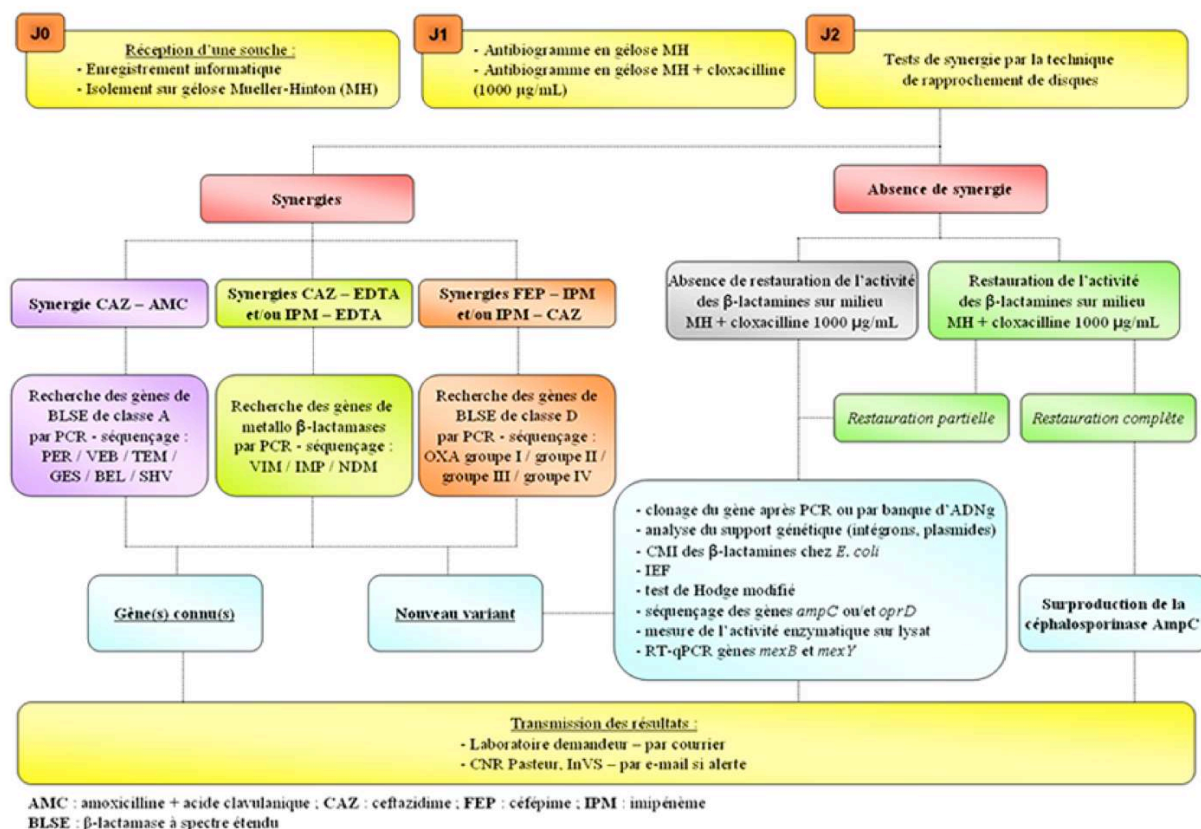
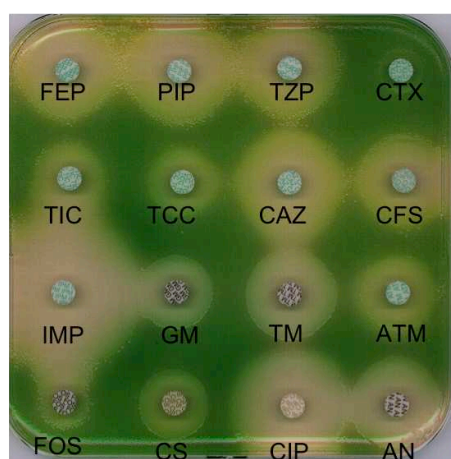


Fig. 15: Démarche d'analyse des souches de *Pseudomonas aeruginosa* suivi par le Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques (CNR)

5.1.6. Résistance par efflux actif

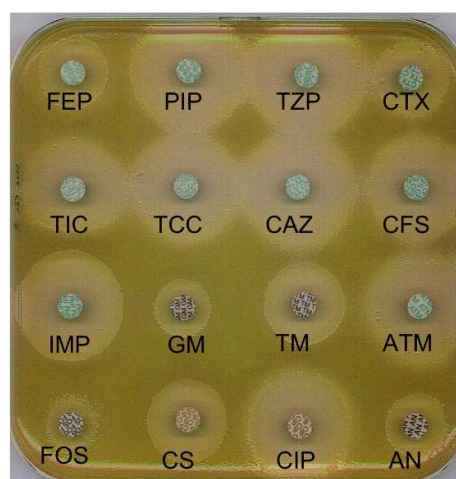
Si les pompes MexAB-OprM et MexXY/OprM interviennent dans la résistance naturelle de *Pseudomonas aeruginosa*, elles contribuent à accroître sa résistance à de nombreux antibiotiques lorsqu'elles sont surproduites. De nombreuses souches cliniques surproduisant l'un ou l'autre voire les deux pompes, ont été caractérisées (Llanes, Hocquet *et al.* 2004; Hocquet, Berthelot *et al.* 2007). Ce phénomène correspond en général à des mutations spontanées au niveau des gènes régulateurs de ces systèmes (Saito, Yoneyama *et al.* 1999). Par rapport aux souches sauvages, un mutant surproducteur de la pompe MexAB-OprM va présenter une résistance accrue vis-à-vis des β -lactamines notamment la ticarcilline, le céfotaxime et l'aztréonam mais également vis-à-vis des fluoroquinolones (ofloxacin, ciprofloxacine, lévofloxacine) (Fig. 16A). La surproduction du système MexXY/OprM entraîne, quant à elle une augmentation de la résistance aux céphalosporines zwitterioniques (céfépime), aux aminosides (gentamicine, amikacine) et aux fluoroquinolones (Fig. 16B).

Des mutants surproducteurs des pompes MexEF-OprN et MexCD-OprJ sont plus rarement observés parmi les souches cliniques (Kohler, Michea-Hamzehpour *et al.* 1997; Gotoh, Tsujimoto *et al.* 1998). Ils résultent de mutations au niveau des gènes régulateurs *mexT* (mutant *nfxC*) et *nfxB* respectivement (Poole, Gotoh *et al.* 1996; Kohler, Epp *et al.* 1999). Une résistance accrue aux céphalosporines zwitterioniques et aux fluoroquinolones, associée à une hypersensibilité à l'aztréonam, à la ticarcilline et à l'imipénème, est caractéristique d'un mutant du système MexCD-OprJ (Fig. 16C). Le phénotype associé à une surproduction de MexEF-OprN est une résistance modérée aux fluoroquinolones et à l'imipénème (Fig. 16D).



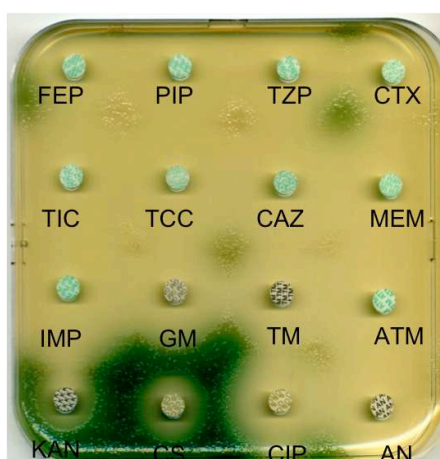
A/

Souche surproductrice de la pompe OprM-MexAB



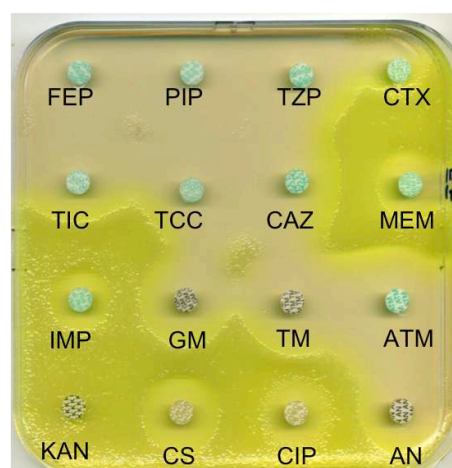
B/

Souche surproductrice de la pompe OprM/MexXY



C/

Souche surproductrice de la pompe OprJ-MexCD



D/

Souche surproductrice de la pompe OprN-MexEF

Fig. 16: Antibiogrammes de souches de *Pseudomonas aeruginosa* surexprimant les systèmes d'efflux (Source : <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr>)

A/ La surproduction de MexAB-OprM génère une résistance aux beta-lactamines (TIC, TCC, ATM) et aux fluoroquinolones (CIP : passage d'une forme carrée à ronde autour de ce disque). B/ La surproduction de MexXY est responsable d'une résistance aux aminosides (GM, TM, AN) ainsi qu'au Céfépime (FEP) et aux fluoroquinolones (CIP). C/ Une diminution de la sensibilité aux fluoroquinolones (CIP) et aux céphalosporines zwitterioniques (FEP) est induite par surexpression du système d'efflux MexCD-OprJ. Enfin, on observe en D/ une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (CIP) lorsque le système d'efflux MexEF-OprN est surexprimé. Elle peut être associée à une augmentation de la résistance aux carbapénèmes (IMP et MEM) par diminution de l'expression de la porine OprD (coréglée avec MexEF-OprN).

5.1.7. Résistance par altération de la perméabilité membranaire

Les β -lactamines doivent franchir la membrane externe grâce à des canaux protéiques transmembranaires appelés porines. Les carbapénèmes présentent la particularité d'utiliser un canal spécifique nommé OprD, contrairement aux autres β -lactamines qui empruntent la voie de la porine OprF (Trias and Nikaido 1990). De nombreuses mutations retrouvées dans les souches cliniques entraînent la perte d'OprD et conduisent à une augmentation de 4 à 16 fois de la résistance aux carbapénèmes alors que la CMI des autres β -lactamines reste inchangée (Fig. 17). Cependant seule la résistance à l'imipénème est exclusivement dépendante du niveau de production d'OprD. Ainsi on trouve certains mutants qui sont résistants à l'imipénème mais sensibles au méropénème et au doripénème (Pai, Kim *et al.* 2001; Sakyo, Tomita *et al.* 2006).

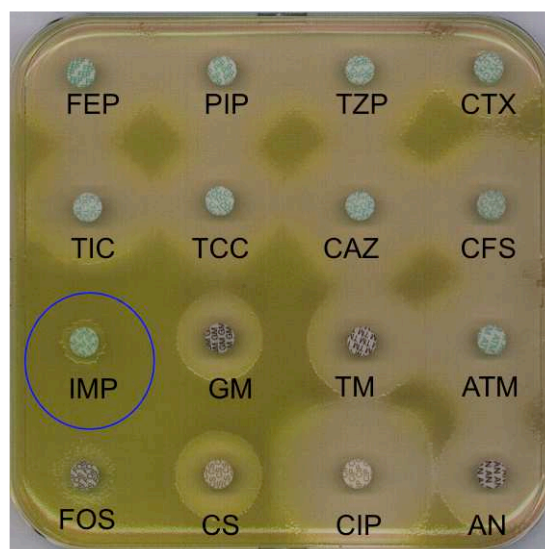


Fig. 17: Antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* n'exprimant plus la porine OprD (Source : <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr>)

A noter, encerclé en bleu : La résistance élevée à l'imipénème caractéristique de la perte d'OprD.

5.1.8. Résistance par modification des cibles cellulaires

Les cibles cellulaires des β -lactamines sont les protéines liant la pénicilline (PBP), enzymes nécessaires à la synthèse du peptidoglycane. Bien que rares, une sous-expression, une surproduction ou une production sous forme altérée des PBP

peuvent être à l'origine d'une résistance spécifiques aux β -lactamines. En effet, des cas de PBP-4 altérée, présentant une faible affinité pour les antibiotiques, ont été reportés après un traitement à l'imipénème ou avec de fortes doses de pipéracilline (Bellido, Veuthey *et al.* 1990). De plus, une hyperproduction de la PLP-3 est à l'origine d'une résistance accrue aux β -lactamines (Pechere and Kohler 1999).

5.2. Aminoglycosides, perturbation de la traduction

5.2.1. Structure et mode d'action

Les premiers aminoglycosides découverts étaient des molécules naturelles produites par des souches de *Streptomyces* et d'*Actinomyces*. Aujourd'hui l'hémisynthèse à partir de ces composés naturels a permis d'augmenter leur diversité. Ce sont des composés poly-osidiques substitués par des fonctions amines (Fig. 18). Ils comportent un noyau central commun constitué d'un 2-desoxystreptamine et de glucosamines et sont divisés en deux familles en fonction des sucres aminés substituant les positions du cycle désoxystreptamine :

- Les aminosides 4,6 disubstitués : kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine
- Les aminosides 4,5 disubstitués : néomycine, ribostamycine

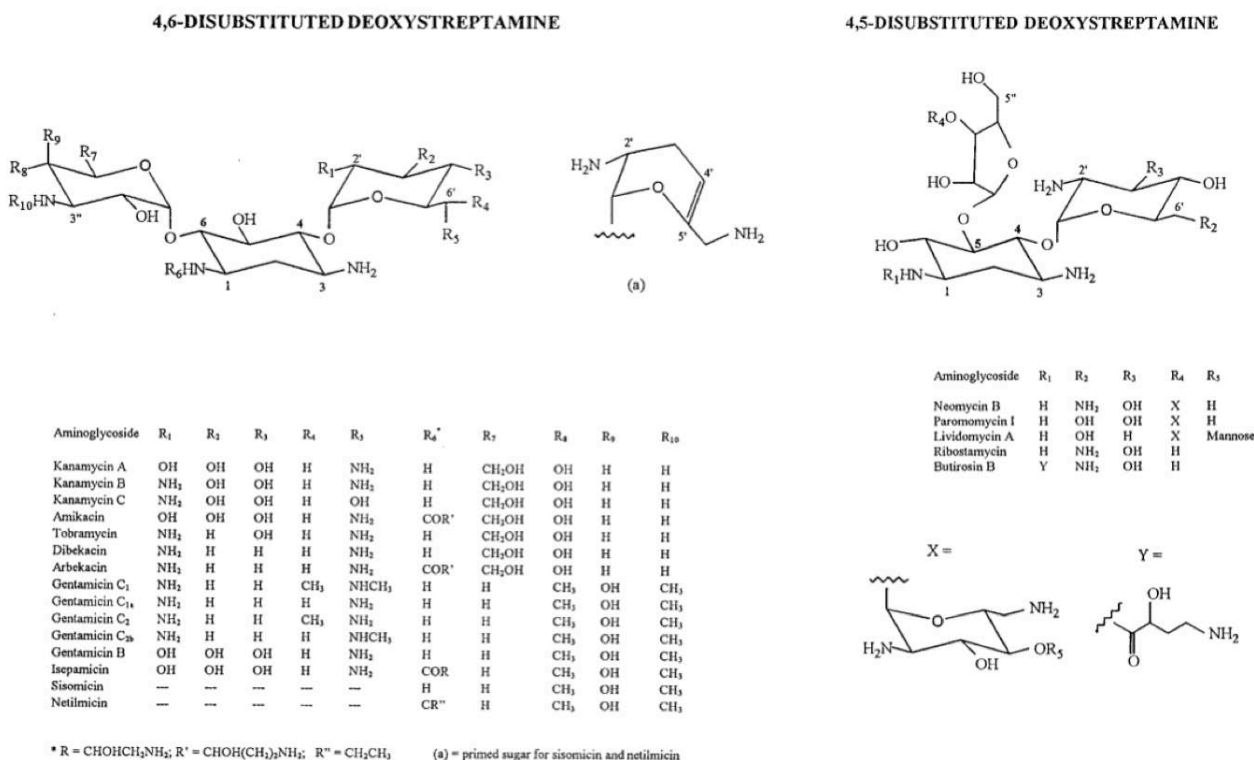


FIG. 1. Structural formulae of the 2-deoxystreptamine-containing aminoglycosides cited in the text. The numbering of the atoms shown in the figure follows the recommendations in reference 73 with the primed numbers (') being ascribed to the sugar attached to the C-4 of the 2-deoxystreptamine (since this C is of the *R* configuration) and the doubly primed numbers (") being ascribed to the sugar attached on either the C-6 (*S* configuration) for the 4,6-disubstituted deoxystreptamine or the C-5 (*R* configuration) for the 4,5-disubstituted-2-deoxystreptamine. Note that sisomicin and netilmicin have a particular primed sugar with a double bond between C-4' and C-5'.

Fig. 18: Structure des aminoglycosides (Mingeot-Leclercq, Glupczynski *et al.* 1999)

La numérotation en (') est attribuée au sucre substitué sur le C4 du 2-desoxystreptamine alors que la numérotation en (") est attribuée au sucre substitué sur le C6 ou C5. Les différentes molécules de la famille des aminosides se différencient par la nature et la position des substituants des trois sucres constitutifs de leur structure.

Leur action s'exerce via la liaison, par leurs fonctions –OH et –NH₂, à la sous-unité 30S des ribosomes et plus particulièrement au niveau du site A de l'ARN ribosomique 16S. Il en découle une accumulation d'erreurs des protéines néo-synthétisées ou un arrêt de la traduction à différents stades.

Comme de nombreuses autres bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* peut acquérir des gènes de résistance aux aminosides portés par des plasmides. Bien que la modification enzymatique constitue le principal mécanisme de résistance aux aminosides, une faible perméabilité membranaire, une surproduction des systèmes d'efflux actif ou encore des modifications au niveau des cibles peuvent expliquer la résistance accrue du bacille pyocyanique à cette classe d'antibiotiques.

5.2.2. Résistance par modification enzymatique

Les enzymes modificatrices des aminoglycosides, sont des enzymes stéréospécifiques qui attachent des groupements phosphate, adényl ou acétyl sur les fonctions $-NH_2$ ou $-OH$ de ces antibiotiques empêchant ainsi leur fixation sur le ribosome. On en distingue ainsi trois classes : les aminosides-N-amino-acétyl transférases (AAC), les aminosides-o-nucléotidyl transférases (ANT) et les aminosides-o-phospho transférases (APH) (Wright 1999). Leurs gènes sont fréquemment portés par des transposons et/ou des intégrons et induisent une expression constitutive des enzymes à l'origine d'une résistance de haut niveau aux aminosides. Toutefois étant donné que ces enzymes sont stéréospécifiques et que la nature et la localisation des fonctions modifiables varient d'un aminoside à l'autre, la résistance qui en découle n'affectera que les substrats spécifiques de chaque enzyme (Fig. 19).

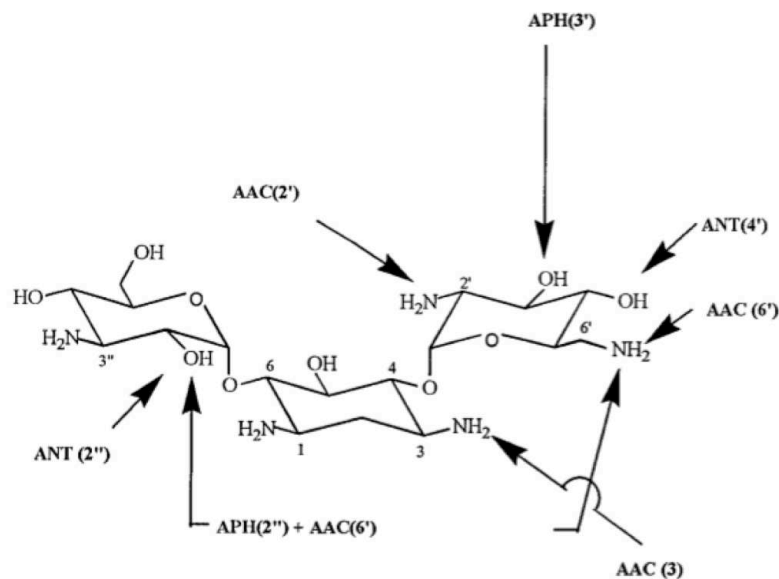


Fig. 19: Localisation des zone d'action des enzymes modificatrices des aminosides (d'après Mingéot-Leclercq, Glupczynski *et al.* 1999)

5.2.2.1. Aminoglycoside acétyltransférases (AAC)

L'acétylation des aminoglycosides peut avoir lieu sur les positions 1-,3-,6'- et 2'- des groupements amines. Les acétyltransférases les plus communes sont : AAC(3) et AAC(6') et sont toutes deux divisées en sous familles. La sous-famille AAC (3)-I qui comporte trois variants chez *Pseudomonas aeruginosa* est un déterminant classique de la résistance à la gentamicine de cet organisme. De la même façon, parmi les AAC(6'), AAC(6')-II sert de déterminant pour la résistance à la gentamicine et la Tobramycine alors que l'AAC(6')-II moins fréquente agit préférentiellement sur l'amikacine (Poole 2005; Ramirez and Tolmasky 2010).

5.2.2.2. Aminoglycoside nucléotidyltransférases (ANT)

La plus fréquente dans cette classe d'enzymes modificatrices des aminosides est ANT(2'). Elle inactive la gentamicine et la tobramycine (Poole 2005). On trouve ensuite dans les isolats cliniques ANT(4'), qui confère une résistance à l'amikacine et à la tobramycine. Une troisième nucléotidyltransférase est décrite chez *Pseudomonas aeruginosa*, elle est active sur la streptomycine mais est

inefficace sur les aminoglycosides utilisés en milieu clinique contre le bacille pyocyanique (Ramirez and Tolmasky 2010).

5.2.2.3. Aminoglycoside phosphoryltransférase (APH)

Les principales APH retrouvées chez *Pseudomonas aeruginosa* agissent sur le 3'-OH de leur cible conférant ainsi généralement une résistance aux aminoglycosides non utilisés en thérapeutique (kanamycine, néomycine, streptomycine) [Poole, 2005]. A cette famille appartient notamment, l'APH(3')-IIb qui, par sa présence dans le génome, est responsable de l'insensibilité générale à la kanamycine du bacille pyocyanique. D'autres APH(3') conférant une résistance vis à vis d'autres aminoglycosides ont été décrites chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit par exemple de APH(3')-VI pour l'amikacine et de l'APH(2'') pour la gentamicine et la tobramycine (Kettner, Milosovic *et al.* 1995).

5.2.3. Résistance par modification de la perméabilité membranaire

Contrairement aux β -lactamines, les aminoglycosides n'empruntent pas de porines pour pénétrer dans la cellule mais franchissent directement la membrane. En effet, leur caractère polycationique leur permet d'interagir avec les lipopolysaccharides localisés dans la membrane externe. Un défaut de charge négative lors de la biosynthèse du lipopolysaccharide entraînera donc une réduction de la pénétration intracellulaire des aminosides. C'est ce que l'on retrouve dans les souches cliniques présentant des altérations sur le locus *rff*. Ces souches présentent un phénotype dit « rough » (aspect sec et rugueux) associé à une sensibilité aux aminoglycosides amoindrie (Evans, Pier *et al.* 1994). Ce type de mutations est fréquemment retrouvé chez les patients atteints de mucoviscidose ou présentant des brûlures surinfectées (Hancock, Mutharia *et al.* 1983; Bryan, O'Hara *et al.* 1984).

5.2.4. Résistance par efflux actif

La pompe MexXY/OprM est le principal mécanisme d'efflux actif responsable de la résistance non enzymatique aux aminoglycosides chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ce phénomène est fréquemment retrouvé en France chez les malades atteints de la mucoviscidose. Si la surexpression de l'opéron *mexXY* entraîne généralement une résistance modérée aux aminosides (facteur 2 à 8 par rapport à la souche de référence PAO1) (Llanes, Hocquet *et al.* 2004), dans le cas de la mucoviscidose, elle peut être à l'origine d'une résistance élevée en absence d'enzymes modificatrices (Sobel, McKay *et al.* 2003; Vogne, Aires *et al.* 2004; Islam, Oh *et al.* 2009). Elle est souvent due à des mutations localisées sur le gène codant pour MexZ, le régulateur de la pompe (mutants *agrZ*). Toutefois, certaines souches cliniques de patients mucoviscidosiques ne présentent aucune altération sur *mexZ* ni dans la région promotrice de *mexXY* (mutants *agrW*) mais sur le locus du gène *parR* (Muller, Plesiat *et al.* 2011). *parR* appartient au bicistron *parRS* codant pour un système à deux composantes influençant l'expression de certains déterminants de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* (ex. *oprD*, *mexXY*).

5.2.5. Résistance par modification de la cible ribosomale

Un nouveau mécanisme de résistance a émergé récemment chez de nombreux bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* mais aussi *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*...). Il ne touche pas l'aminoside mais modifie l'ARN16S sur lequel l'antibiotique se fixe. La production des méthylases RmtA et RmtD (Resistance Methylase Transferase) retrouvées dans de nombreux isolats cliniques au Japon en 2003 et au Brésil en 2007, confère une résistance aux 2-déoxystreptamines bisubstituées en 4,6 i.e. la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine, l'isépamycine et l'arbékacine (Yokoyama, Doi *et al.* 2003; Doi and Arakawa 2007).

La production simultanée d'une méthylase de l'ARN 16S et d'une métallo- β -lactamase rendra les souches résistantes à tous les aminosides et β -lactamines illustrant le risque élevé d'évolution rapide vers la toto-résistance (Doi, de Oliveira Garcia *et al.* 2007).

5.2.6. Résistance via la production d'alginate et la formation de biofilm

Une production massive d'alginate (polymère d'acide D-mannuronique et d'acide L-gulonique) ou la formation de biofilm par les souches de *Pseudomonas aeruginosa* joue le rôle de barrière protectrice pour les bactéries vis-à-vis des défenses immunitaires de l'hôte. Les souches productrices d'alginate, qualifiées de « souches muqueuses » sont retrouvées principalement chez les patients atteints d'infections chroniques. Quant aux souches vivant sous forme de biofilms, elles peuvent devenir 1000 fois plus résistantes que leurs homologues se développant à l'état planctonique (Nickel, Ruseska *et al.* 1985). La tobramycine, la gentamicine, l'amikacine et la streptomycine sont capables d'induire la formation de biofilms (Hoffman, D'Argenio *et al.* 2005; Elliott, Burns *et al.* 2010) et la pénétration réduite de ces antibiotiques générée par ce mode de vie particulier, tend à diminuer leur efficacité (Nichols, Dorrington *et al.* 1988; Khan, Bernier *et al.* 2010). Ainsi Shigeta, Tanaka *et al.* (1997) ont montré que si les fluoroquinolones ont une excellente pénétration au sein du biofilm, la pipéracilline et l'imipénème ont davantage de difficultés et ce sont surtout les aminoglycosides qui ont le plus faible taux de pénétration (Shigeta, Tanaka *et al.* 1997). Enfin, une analyse des gènes exprimés au sein du biofilm, a mis en évidence la surexpression du gène *toIA* (Whiteley, Banger *et al.* 2001), dont l'implication est connue pour réduire la liaison des aminoglycosides au LPS et donc limiter leur pénétration (Rivera, Hancock *et al.* 1988).

5.3. Fluoroquinolones

5.3.1. Structure et mode d'action

Les fluoroquinolones (ou 4-quinolones) sont des antibactériens de synthèse dérivant de l'acide nalidixique. Elles possèdent un noyau 4-oxo,3-carbonyl,pyridine et un fluor en position 6 (Fig. 20). Cette famille comprend la ciprofloxacin, la norfloxacin, l'ofloxacin, la péfloxacin, la moxifloxacin et la lévofloxacin.

Ces molécules possèdent un spectre très étendu puisqu'elles bloquent la réplication bactérienne via l'inhibition de deux enzymes : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Khodursky and Cozzarelli 1998).

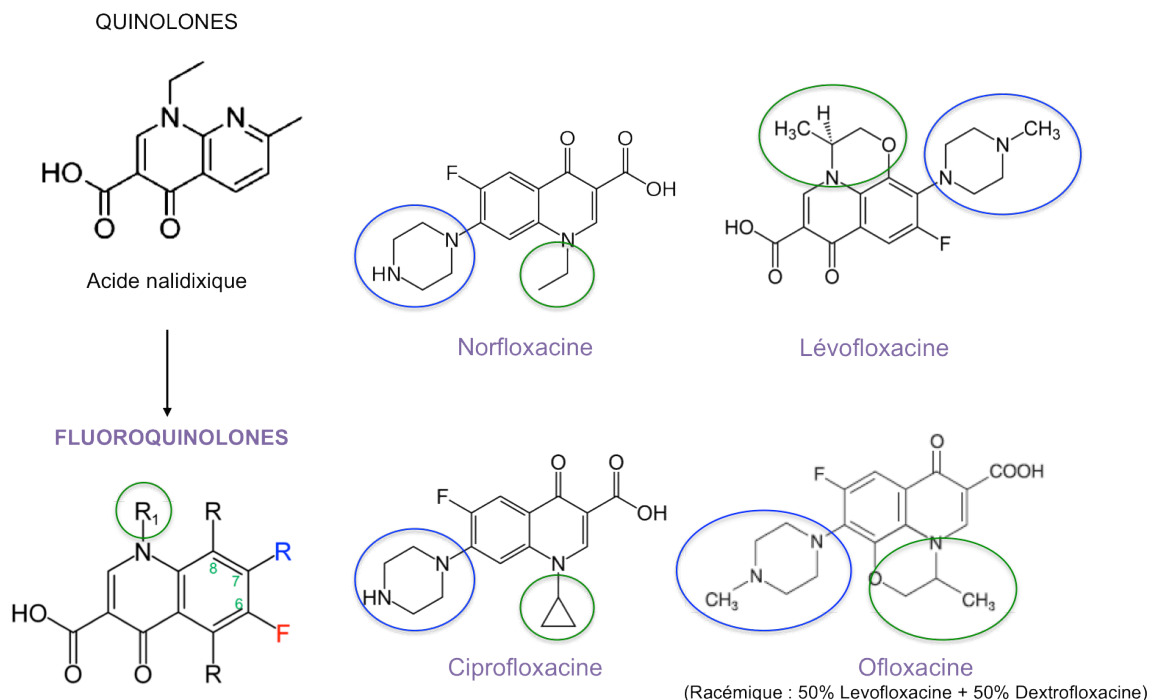


Fig. 20: Structure des fluoroquinolones

La résistance aux fluoroquinolones chez *Pseudomonas aeruginosa* est due à des mutations dans les Quinolone Resistance Determining Regions (QRDR) des gènes cibles et à la surexpression de pompes d'efflux.

5.3.2. Résistance par modification des cibles

Les deux enzymes cibles des fluoroquinolones, sont composées de deux sous unités, respectivement : GyrA et GyrB, et ParC et ParE. Des mutations dans les QRDR des gènes correspondants affectent la liaison des fluoroquinolones sur leurs cibles (Jacoby 2005). Ces mutations apparaissent avec une fréquence allant de 10^{-9} à 10^{-6} . Les mutations sur le gène *gyrA* sont les plus fréquentes, générant une augmentation de la CMI de la ciprofloxacine de 1 à 64 mg/L. Les mutations de *parC* sont plus rares mais l'association simultanée de mutations sur ces deux gènes (*gyrA* et *parC*) conduit à des niveaux de résistance très élevés (128 mg/L) (Akasaka, Tanaka *et al.* 2001; Lee, Lee *et al.* 2005; Muramatsu, Horii *et al.* 2005). La ciprofloxacine et la lévofloxacine sont les fluoroquinolones ayant la meilleure activité intrinsèque sur *Pseudomonas aeruginosa* mais elles ne peuvent

malheureusement pas être utilisées seules en raison de la fréquence élevée de mutations survenant sur leurs cibles.

5.3.3. Résistance par efflux actif

Quatre systèmes d'efflux ont été largement décrits chez *Pseudomonas aeruginosa* : MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY/OprM. Bien que chacun présente un pool préférentiel d'antibiotiques substrats (Masuda, Sakagawa *et al.* 2000), les fluoroquinolones peuvent être prises en charge par toutes ces pompes. En absence de mutation cible, la surexpression des systèmes d'efflux n'est responsable que d'une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones. Le niveau élevé de résistance du bacille pyocyanique pour cette classe d'antibiotiques résultera donc de l'action conjointe des différentes pompes d'efflux causée par les mutations *nalB*, *nfxB* et *nfxC* associée aux mutations sur les enzymes cibles (Jalal, Ciofu *et al.* 2000; Le Thomas, Couetdic *et al.* 2001; Higgins, Fluit *et al.* 2003). Les nouvelles fluoroquinolones sont sélectives des mutants *nfxB* (i.e. pompe MexCD-OprJ) alors que les anciennes quinolones sélectionnent préférentiellement les mutants *nfxC* et *nalB* (Kohler, Michea-Hamzehpour *et al.* 1997).

5.4. Colistine, désorganisation de la membrane

5.4.1. Structure et mode d'action

La colistine appartient à la famille des polymyxines. Il s'agit d'un décapeptide cyclique cationique relié à un acide gras via une liaison α -amide (Fig. 21). Les acides aminés composant la chaîne polypeptidique sont : la D-Leucine, L-Thréonine et l'acide L- α - γ -diaminobutyrique. L'acide gras peut être l'acide 6-méthyl-octanoïque (Polymyxine A ou E1) ou l'acide 6-méthyl-heptanoïque (Polymyxine B ou E2). En général les préparations pharmaceutiques contiennent un mélange de ces deux composés.

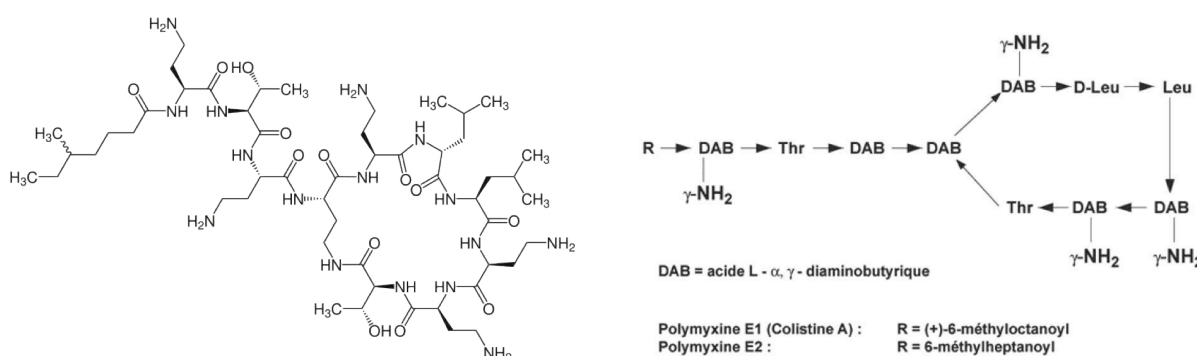


Fig. 21: Structure de la colistine

Egalement appelé Polymyxine E, cet antibiotique cible les membranes bactériennes. Au niveau de la membrane externe, il va déplacer les contre ions (Ca^{2+} et Mg^{2+}) qui stabilisent normalement le lipopolysaccharide puis il va désorganiser la membrane cytoplasmique aboutissant à la libération du contenu cellulaire. Des images en microscopie électronique montrent d'ailleurs la formation de projections fibreuses correspondant au matériel cytoplasmique libéré au travers des trous formés par l'action de la colistine (Koike, Iida *et al.* 1969). La colistine possède également une activité anti-endotoxine par neutralisation du LPS en se liant à lui.

5.4.2. Résistance par modification de la paroi membranaire

Bien que possédant une activité intrinsèque intéressante vis-à-vis des organismes à Gram négatif, cet antibiotique est très peu utilisé en thérapie du fait de sa néphrotoxicité (Falagas and Kasiakou 2005). Il n'est donc en général administré qu'aux patients atteints de mucoviscidose, par inhalation, afin de tenter d'éradiquer une colonisation précoce ou intermittente du bacille pyocyanique (Jensen, Pedersen *et al.* 1987).

Le mode d'action très direct de la colistine ne se prête pas au développement d'une résistance, pourtant *Pseudomonas aeruginosa* parvient parfois à modifier la structure de sa membrane afin de la rendre imperméable à cet antibiotique (Johansen, Moskowitz *et al.* 2008). Ainsi la substitution d'un aminoarabinose (le 4-amino-4-deoxy-L-arabinose), sur le lipide A constitutif du LPS est décrit comme le mécanisme majeur de résistance aux polymyxines *in vitro* (Moskowitz, Ernst *et*

al. 2004). De telles modifications du lipide A du LPS ont également été mises en évidence chez des patients mucoviscidosiques (Ernst, Yi *et al.* 1999). Cette modification est générée par les produits du locus *arnBCADTEF* dont la régulation implique trois systèmes à deux composantes : PhoPQ, PmrAB et ParRS (Fig. 22).

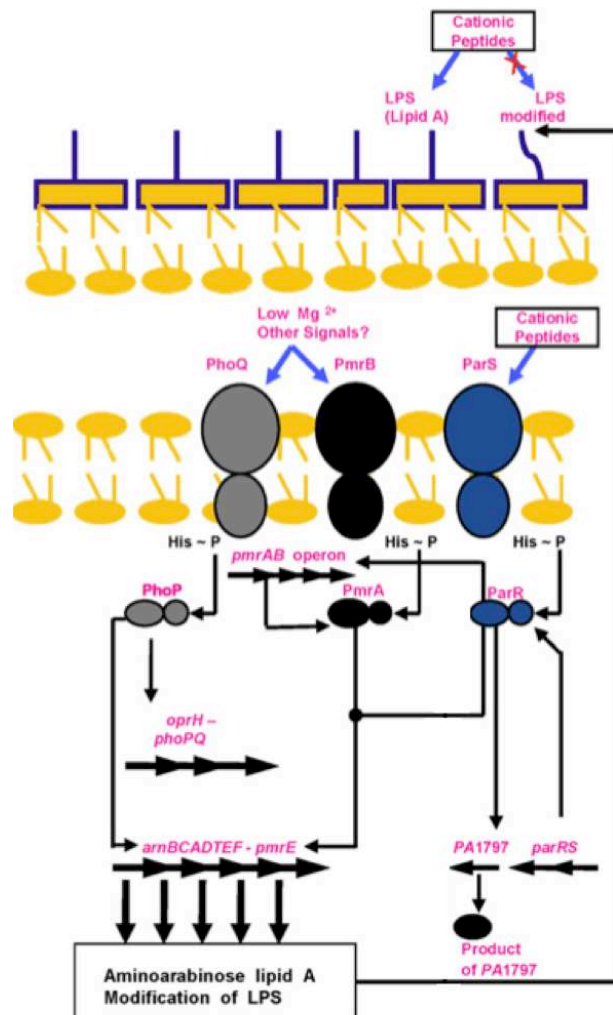


Fig. 22: Systèmes de régulation impliqués dans la résistance adaptative à la colistine
(Skiada, Markogiannakis *et al.* 2011)

Les peptides cationiques activent le système ParRS qui va lui même activer l'opéron *arnBCADTEF* directement ou via l'induction de l'opéron *pmrAB*. Il en résulte une modification du LPS par incorporation du 4-arabinose dans le lipide A, qui va limiter la fixation des peptides cationiques à la membrane externe. Ce phénomène est également induit en cas de carence en Mg²⁺ par l'activation des systèmes de régulation PhoPQ et PmrAB.

Des altérations de ces trois systèmes régulateurs ont d'ailleurs été retrouvés dans des isolats cliniques (Barrow and Kwon 2009; Muller, Plesiat *et al.* 2011)

- *phoP* et *phoQ* appartiennent à un opéron unique avec *oprH*. L'expression de ces 3 gènes est induite uniquement en condition de carence en Mg^{2+} . En effet, si PhoP semble capable d'activer fortement la transcription de l'opéron quelles que soient les conditions, PhoQ jouerait un rôle de régulateur en déphosphorylant PhoP en réponse aux faibles concentrations de Mg^{2+} (Macfarlane, Kwasnicka *et al.* 1999). OprH exprimée via ce système à deux composantes, devient alors la protéine majeure de la membrane externe et mimerait l'action des cations pour restaurer la rigidité du LPS nécessaire à la résistance (Bell, Bains *et al.* 1991).
- Le système PmrA-PmrB a été largement caractérisé chez *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Gunn, Lim *et al.* 1998) et un système homologue a été retrouvé chez *Pseudomonas aeruginosa* (McPhee, Lewenza *et al.* 2003; Fernandez, Gooderham *et al.* 2010). L'expression de l'opéron *pmrAB* est induite par de faibles concentrations de Mg^{2+} mais indépendamment de PhoPQ. PmrB est la kinase senseur, nécessaire à l'activation de PmrA qui se lie sur la région promotrice de l'opéron en vue de sa transcription.

ParRS apparaît comme le système régulateur impliqué dans la résistance adaptative en répondant directement aux polypeptides et non plus à une déplétion en cations (Fernandez, Gooderham *et al.* 2010). Des mutations affectant le régulateur ParR ou la kinase senseur ParS peuvent générer une résistance constitutive aux polypeptides cationiques chez *Pseudomonas aeruginosa* via la surexpression de l'opéron *arnBCADTEF-ugd* (Muller, Plesiat *et al.* 2011). Le signal perçu par ParS reste pour l'heure inconnu et son identification sera un pré-requis pour le développement de nouveaux agents capables de bloquer cette réponse adaptative.

6. La multi résistance de *Pseudomonas aeruginosa*, une impasse thérapeutique ?

Pseudomonas aeruginosa possède un arsenal de mécanismes lui permettant de résister aux antibiotiques, aboutissant souvent à une impasse thérapeutique dans la lutte contre ces infections. Face à cette multi résistance toujours croissante et à la difficulté de développer de nouveaux antibiotiques, il apparaît aujourd'hui inévitable de devoir trouver de nouvelles stratégies pour combattre le bacille pyocyanique, premier agent infectieux nosocomial en terme de mortalité.

6.1. Une nouvelle stratégie : contourner le mécanisme d'efflux

L'inhibition des pompes d'efflux semble être une alternative intéressante, à utiliser en synergie avec les traitements actuels. En effet, si chaque classe d'antibiotiques génère des mécanismes de résistance qui lui sont propres, l'activation des systèmes d'efflux semble être un déterminant commun et en outre leur spécificité ne se restreint généralement pas à une seule famille d'antibiotiques.

Dans ce contexte, il semble donc tout à fait pertinent de s'attacher à trouver soit un inhibiteur spécifique soit un inhibiteur commun de ces pompes d'efflux qui serait utilisé en combinaison avec les antibiotiques actuels afin de potentialiser leur efficacité. Ainsi cet EPI (*efflux pump inhibitor*) augmenterait la concentration intracellulaire de l'antibiotique délivré, restaurerait son activité contre les souches résistantes et limiterait le développement supplémentaire de telles souches.

Cet inhibiteur pourrait toutefois agir à différents niveaux (Fig. 23) : (1) inhiber le substrat par un mécanisme de liaison compétitive ou non, (2) interférer avec les mécanismes régulant l'expression des pompes d'efflux, (3) perturber le système énergétique nécessaire à l'activité de la pompe, (4) bloquer la protéine canal de la membrane externe, ou encore (5) empêcher l'assemblage de ces systèmes tripartites. Enfin, une stratégie plus classique pourrait consister à (6) modifier la structure d'antibiotiques actuels afin qu'ils ne soient plus reconnus par les systèmes d'efflux.

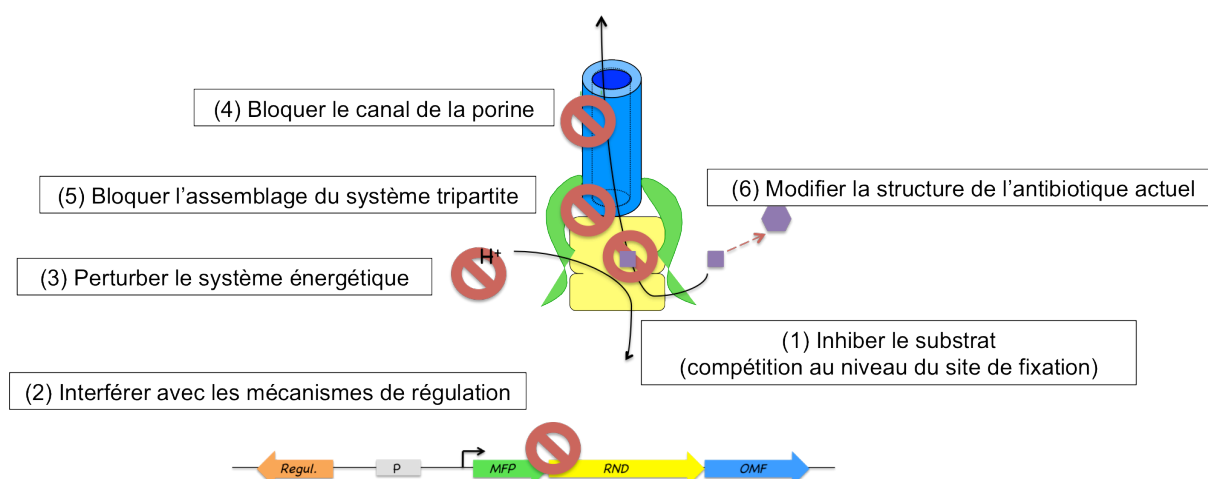


Fig. 23: Différentes stratégies envisageables pour inhiber les systèmes d'efflux

6.2. Les EPI disponibles actuellement

6.2.1. Les agents perméabilisant la membrane

Parmi ces agents, les polymyxines, et notamment la Polymyxine B, présentent des propriétés intéressantes. En effet, nous l'avons vu précédemment, grâce à leur liaison au lipopolysaccharide elles perméabilisent la membrane externe pour faciliter le passage d'antibiotiques hydrophobes ou d'autres composés bactéricides (Tsubery, Yaakov *et al.* 2005). Cependant leur utilisation reste limitée du fait de leur nocivité.

6.2.1.1. Les agents ciblant l'énergie de la pompe

Des composés tels que le carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) (Fig. 24B) sont classiquement utilisés dans les laboratoires pour abolir l'efflux de nombreuses molécules. Ils réduisent la viabilité cellulaire en dissipant la force proto-motrice membranaire ; cependant la question de savoir si leur effet passe par une meilleure pénétration de l'antibiotique ou par une altération de l'enveloppe cellulaire, reste ouverte. En outre, ce sont des composés nocifs et cytotoxiques également substrats des pompes d'efflux bactériennes. A l'heure actuelle, aucun composé « bloqueur d'énergie » n'a été développé dans une visée thérapeutique.

6.2.1.2. Les inhibiteurs de la fonction de la pompe

6.2.1.2.1. Les peptidomimétiques

Le premier composé de cette famille à avoir été isolé est le MC-207 110 ou phénylalanine arginyl β -naphthylamide (PA β N) (Fig. 24B). Il est issu d'un criblage haut débit basé sur la capacité à restaurer la sensibilité de différentes souches cliniques à la lévofloxacin. Son activité vis à vis d'autres antibiotiques tels que le chloramphénicol et les macrolides a également été rapportée (Lomovskaya, Warren *et al.* 2001), lui conférant le statut d'inhibiteur à large spectre des pompes d'efflux.

L'étude de son mécanisme d'inhibition a permis de montrer que le PA β N était en fait un substrat des pompes d'efflux qui agirait comme inhibiteur compétitif en se liant sur la même poche d'affinité que les antibiotiques (Yu, Aires *et al.* 2005; Lomovskaya and Bostian 2006).

Essential Therapeutics et Daiichi Pharmaceutical ont développé des dérivés du MC-207 110 afin d'améliorer la stabilité biologique du composé ainsi que son profil pharmacocinétique et thérapeutique mais le problème majeur de cette famille d'EPI reste encore leurs propriétés toxiques.

6.2.1.2.2. Dérivés des quinolines

Cette nouvelle classe de composés comprenant des pyrido-, alkoxy-, alkylamino- et chloro- dérivés (Fig. 24D), a vu le jour grâce à des criblages réalisés sur des souches d'*Enterobacter aerogenes* visant à restaurer leur sensibilité vis à vis de différentes classes d'antibiotiques (quinolones, phénicol, cyclines). Par des mesures de concentration intracellulaire d'antibiotiques, il a été montré que ces composés avaient une activité directe sur le mécanisme d'efflux. (Chevalier, Atifi *et al.* 2001; Mallea, Mahamoud *et al.* 2003). L'encombrement stérique généré par ces EPI au niveau du site de fixation serait vraisemblablement à l'origine de leur activité inhibitrice. De plus, ils sont considérés comme des inhibiteurs à large spectre chez *Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella pneumoniae* mais ont une efficacité

plus partielle chez *Pseudomonas aeruginosa* (Chevalier, Bredin *et al.* 2004; Chevalier, Mahamoud *et al.* 2010).

Des tests de toxicité et de pharmacodynamique restent à faire avant de valider leur potentialité thérapeutique mais leur proximité avec la famille des quinolones laisse à penser qu'ils auront une pharmacocinétique efficace et peu d'effets indésirables.

6.2.1.2.3. Dérivés des pyridopyrimidines et des arylpipérazines

Ces dérivés (Fig. 24C) ont été testés pour leur activité inhibitrice sur la pompe MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*. Ils ne possèdent pas d'activité antibactérienne intrinsèque mais agissent, par un mécanisme indéterminé, en tant que potentialisateurs de l'activité des antibiotiques. Toutefois, ils présentent une faible stabilité et une haute affinité pour les protéines sériques. L'augmentation de leur solubilité sera nécessaire avant d'envisager une utilisation intravéneuse (Nakayama 2003-2004).

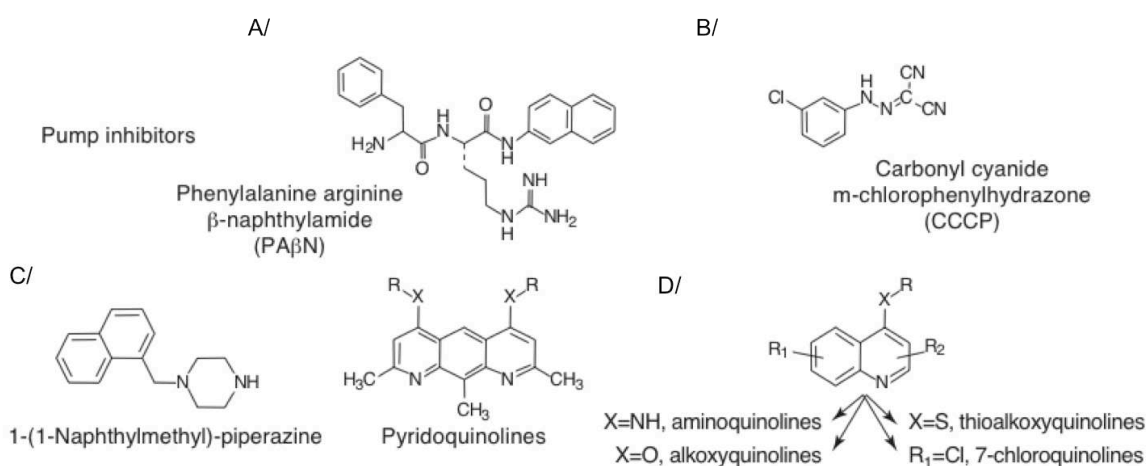


Fig. 24: Quelques exemples d'inhibiteurs des systèmes d'efflux (EPIs)

(Pages, Masi *et al.* 2005)

En (A/) un exemple de peptidomimétiques, en (B/) un agent dissipant la force proton-motrice, en (C/) un exemple de dérivé arylpipérazine et en (D/) la structure générale des EPIs dérivant des quinolines.

L'inhibition des pompes d'efflux, en bloquant spécifiquement la porine de la membrane externe ou l'assemblage du système tripartite, est une approche très attractive mais non encore développée, car elle nécessite au préalable de bien comprendre les mécanismes structuraux et dynamiques mis en jeu par ces systèmes d'efflux. De nombreux efforts à cette fin se sont portés ces dernières années sur l'étude du fonctionnement des pompes AcrAB-TolC et MexAB-OprM d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* mais cela reste à ce jour à l'état de « modèle ».

7. Structure et assemblage des pompes d'efflux

Comme nous l'avons vu précédemment, le séquençage entier du génome de *Pseudomonas aeruginosa* a permis d'identifier 12 gènes codant pour des pompes d'efflux de la famille des transporteurs RND et 4 d'entre elles ont prouvé leur implication dans la résistance aux antibiotiques : MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ et MexXY/OprM. Ces systèmes sont composés de trois protéines :

- une protéine dans la membrane cytoplasmique de la famille RND (MexB, MexF, MexD, MexY), qui agit comme une pompe en utilisant la force proton-motrice pour expulser différents substrats,
- une protéine de type OMF (Outer Membrane Factor), souvent qualifiée de « porine » et située dans la membrane externe (OprM, OprN, OprJ),
- une troisième protéine périplasmique, de type MFP (Membrane Fusion Protein) ancrée dans la membrane cytoplasmique par un palmitate N-terminal et qui sert à assurer l'association des deux autres protéines.

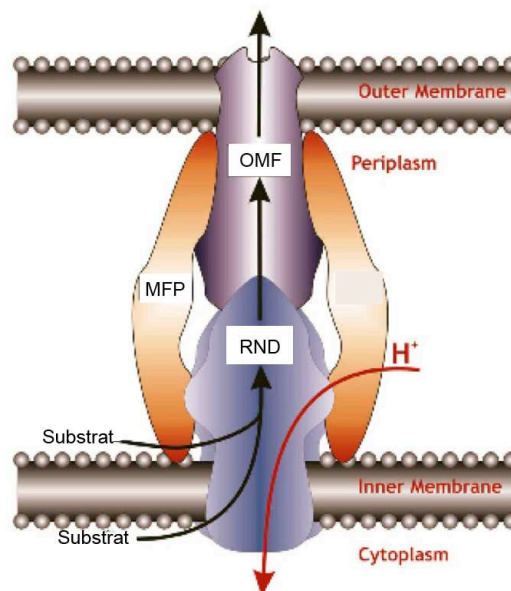


Fig. 25: Schéma représentatif d'une pompe d'efflux

Bien que la structure cristallographique de chaque protéine composant la pompe MexAB-OprM ait été résolue, la compréhension mécanistique de ces systèmes

d'efflux a surtout avancé grâce à l'apport des nombreuses études réalisées sur la pompe AcrAB-TolC, le système équivalent chez *Escherichia coli*. En effet, alors que l'identité de séquence entre les protéines équivalentes des deux organismes n'est pas très élevée (69% entre les RND, 55% entre les MFP et seulement 19% pour les OMF), leurs structures tri-dimensionnelles et leur organisation structurale en système tripartite sont vraisemblablement similaires.

7.1. Le transporteur RND

7.1.1. Aspects structuraux

La structure cristallographique de MexB a été obtenue en 2009 (Sennhauser, Bukowska *et al.* 2009) mais la première structure d'un transporteur RND à avoir été résolue est celle d'AcrB d'*E. coli* (Murakami, Nakashima *et al.* 2002) pour laquelle on dispose à ce jour d'un plus grand nombre d'informations. Ce transporteur du système de sécrétion de type I s'organise sous forme d'un homotrimère de 330kDa en forme de « méduse ». Chaque protomère, composé de 1049 acides aminés, peut être subdivisé en trois domaines : un domaine transmembranaire de 50 Å d'épaisseur, un domaine intermédiaire de 40 Å et enfin un domaine de 30 Å qui sert d'amarrage pour la protéine OMF (Fig. 26A).

7.1.1.1. Le domaine transmembranaire

Le domaine inséré dans la membrane interne est composé de 12 hélices α transmembranaires regroupées en deux blocs (TM1 à TM6 et TM7 à TM12) reliés via une treizième hélice ($l\alpha$) couchée à la surface de la membrane cytoplasmique (Fig. 26C). Les seuls contacts interprotomères au sein de ce domaine sont localisés entre les hélices TM1 et TM8. De plus, une grande cavité est formée par le trimère, elle s'ouvre de 30 Å du côté cytoplasmique pour se rétrécir à 14 Å du côté périplasmique (Fig. 26B).

7.1.1.2. Le domaine pore

Le domaine pore, ou domaine d'entrée est composé de quatre sous-domaines α/β (PN1, PN2, PC1 et PC2). PN1 et PN2 sont situés entre les hélices TM1 et TM2 alors que PC1 et PC2 sont localisés entre TM7 et TM8 (Fig. 26A). Chaque sous-domaine comporte un motif répété caractéristique β - α - β agencé de manière à voir ses deux feuillets β antiparallèles au centre, encerclés par les hélices α . Sur une vue perpendiculaire à la membrane, une crevasse se dessine entre les domaines PC1 et PC2 (Fig. 26D). D'une profondeur de 15 Å et longue de 40 Å, elle pourrait être le site de fixation de la protéine de fusion périplasmique. Sur une vue supérieure, les hélices 2 des domaines PN1 forment un pore central fermé mais une cavité nommée vestibule apparaît entre les domaines PN2 et PC2 de deux protomères voisins. Cette ouverture servirait de porte d'entrée aux substrats (Fig. 26D).

7.1.1.3. Le domaine « chapeau »

Le dernier domaine d'AcrB comprend les domaines DC et DN. Chaque sous-domaine est formé de feuillets β servant de base de support pour les hélices. Le sous-domaine possède en plus un long feuillet β qui pénètre dans le protomère voisin afin de stabiliser le trimère. Le trimère des domaines d'amarrage forme un entonnoir dont le diamètre supérieur est compatible avec le diamètre de l'extrémité périplasmique de la protéine OMF (Fig. 26B).

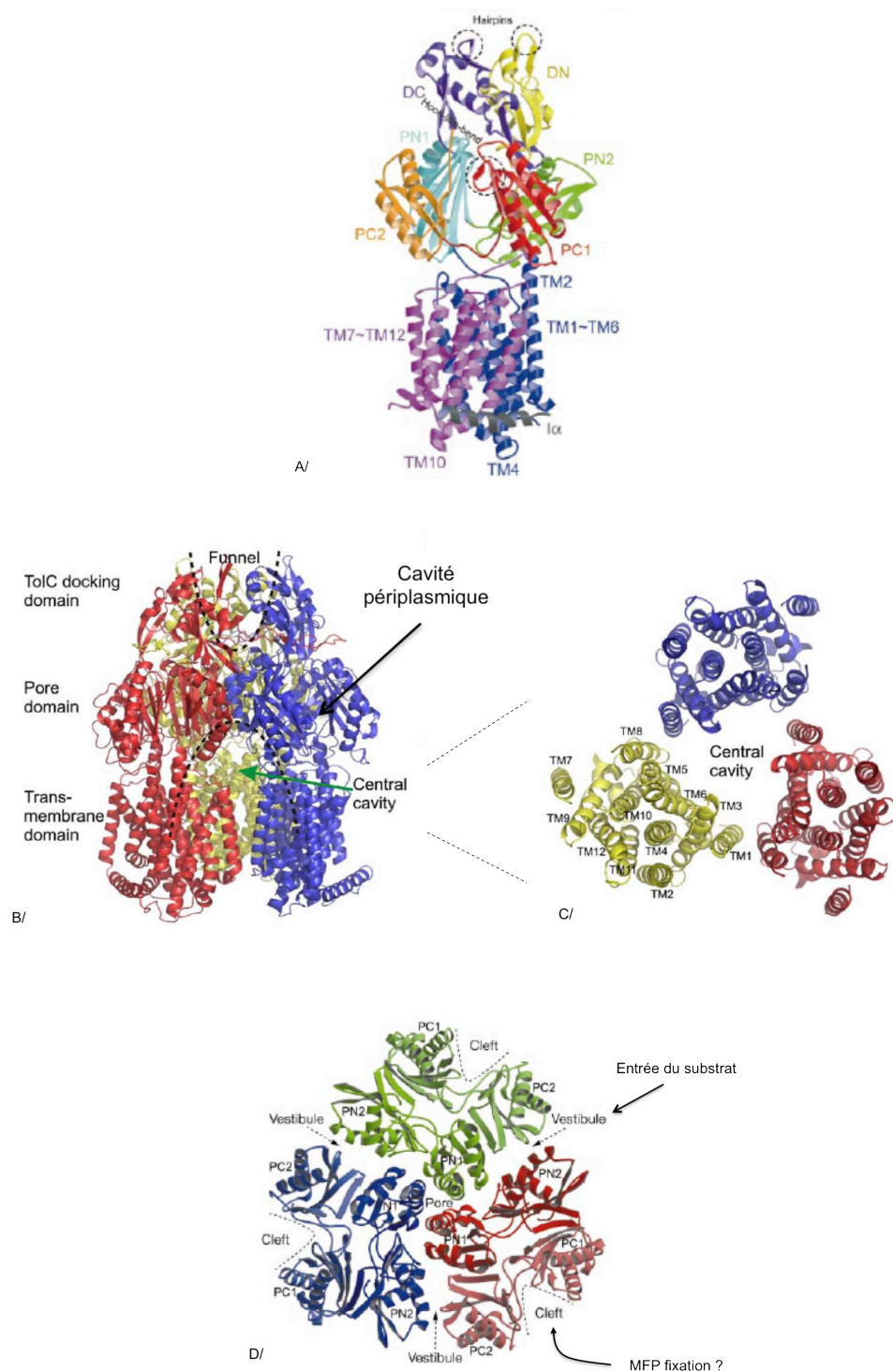


Fig. 26: Structures cristallographiques d'AcrB

(A) Structure du monomère d'AcrB faisant apparaître les sous domaine d'AcrB. (B) Structure en rubans du trimère d'AcrB faisant apparaître les différents domaines et cavités du transporteur (Murakami, Nakashima et al. 2002). (C) Vue supérieure du domaine transmembranaire (Seeger, von Ballmoos et al. 2008). (D) Vue supérieure du domaine pore.

7.1.2. Aspects mécanistiques

Cette première structure d'AcrB a permis de visualiser l'architecture globale du transporteur mais une trentaine de structures d'AcrB, sauvage ou muté, en présence de ligands ou d'inhibiteurs, sont venues étayer la description du fonctionnement de la pompe du point de vue de ses changements conformationnels, de la fixation des substrats, et du pompage des protons.

7.1.2.1. Fixation de ligands

Une première série de structures d'AcrB en présence de différents ligands (rhodamine 6G, le bromure d'éthidium, du déqualinium et la ciprofloxacine) a été résolue par Yu, McDermott *et al.* (2003). Toutes ces structures présentent les ligands logés dans une grande cavité centrale et font intervenir des acides aminés différents pour l'interaction. Toutefois, les ligands étant bloqués à l'entrée du pore, ces structures n'apportent pas davantage d'information sur le mécanisme fonctionnel d'AcrB. Un mutant du transporteur RND, gardant l'activité de pompe, a donc été réalisé par ces mêmes auteurs (Yu, Aires *et al.* 2005) afin de faciliter l'ouverture du pore au niveau de la constriction maximale. La mutation N109A ainsi formée a permis une ouverture du pore de 3 Å avec un élargissement de la poche périplasmique et a abouti à trois nouvelles structures en présence de cinq ligands (la rhodamine 6G, le bromure d'éthidium, la ciprofloxacine, la nafcilline, et le PAβN). Cette fois-ci les ligands ne se retrouvent plus uniquement dans la cavité centrale mais également dans une dépression périphérique du domaine périplasmique (Fig. 27). Cependant, la faible résolution des structures (3,2 à 3,8 Å) ne permet pas de déterminer avec précision les résidus d'AcrB impliqués dans les liaisons électrostatiques avec les ligands. Malgré tout, en mutant certains résidus de cette poche, des variations suffisantes de CMI ont été mises en évidence, confirmant l'importance de cette zone dans le chemin d'efflux. Ceci est d'ailleurs confirmé par des mutants aléatoires sur MexB (R716H-MexB équivalent à R717-AcrB) (Middlemiss and Poole 2004) ou des mutants spontanés de MexD (N673T-

MexD équivalent à T676-AcrB et E89K-MexD équivalent à Q89-AcrB) (Mao, Warren *et al.* 2002) qui présentent une modification de spécificité de substrats.

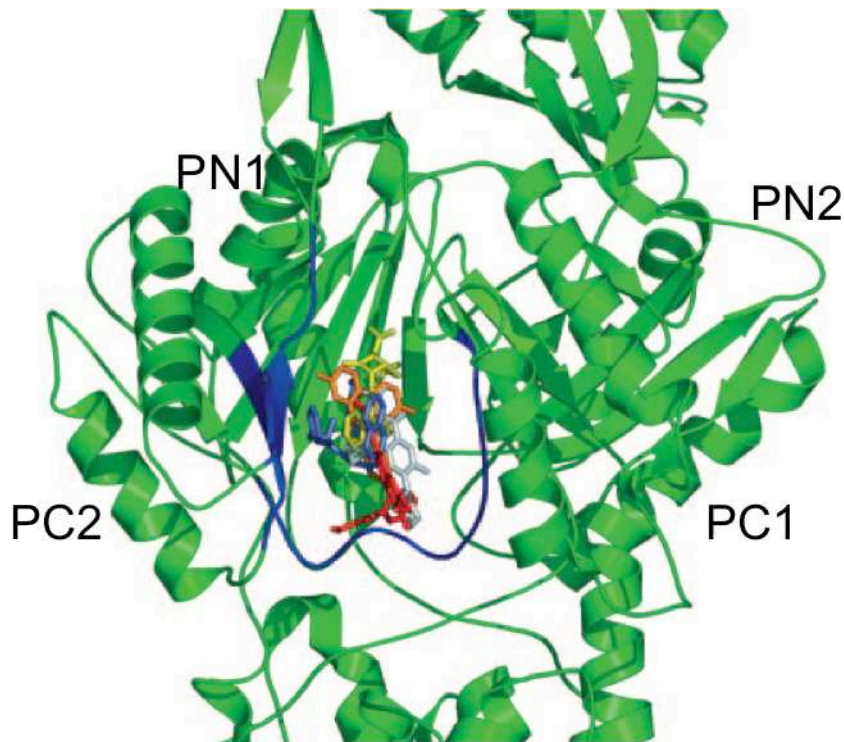


Fig. 27: Poche de liaison périplasmique du mutant N109A d'AcrB

Différents ligands : la ciprofloxacine (gris), le bromure d'éthidium (orange), la rhodamine 6G (rouge), la nafcilline (jaune), et le PAβN (bleu) sont représentés au sein de la poche périplasmique d'AcrB colorée en bleu foncé sur la structure en Cα du mutant.

7.1.2.2. Le chemin des protons

Une nouvelle série de mutants d'AcrB a été créée dans l'objectif de perturber le relai de protons au niveau du domaine transmembranaire afin de vérifier si des changements conformationnels plus éloignés dans la structure pouvaient en résulter. Les acides aminés D407, D408, K940, T978 formant un réseau de liaisons hydrogène ou ponts salins ont donc été alternativement transformés en alanine afin d'empêcher la protonation du groupement carboxyle d'un des deux résidus Asp par transfert d'un proton de la Lysine (Su, Li *et al.* 2006). Les changements conformationnels induits par ces mutations ont surtout élargi de 2 Å l'espacement entre les TM1 et TM8' de deux monomères adjacents sans

créer de réels changements au niveau de la poche périplasmique. Toutefois, Seeger, Schiefner et al. en 2006, ont confirmé l'importance du résidu D408 dans la translocation de proton, complété par le résidu R971 (Seeger, Schiefner et al. 2006).

7.1.2.3. Le mécanisme de pompe péristaltique

Malgré les apports d'informations fournies par les structures décrites précédemment, le mécanisme de fonctionnement du transporteur RND restait incompris. Il aura fallu attendre 2006 et de nouvelles structures pour combler ce manque (Murakami, Nakashima et al. 2006; Seeger, Schiefner et al. 2006; Sennhauser, Amstutz et al. 2007). En effet, jusqu'alors toutes les structures avaient été résolues dans le groupe d'espace R32 et à basse résolution. Ce groupe d'espace reliant les molécules par un axe de symétrie d'ordre trois, il était impossible de déceler une quelconque différence entre les trois monomères. La co-cristallisation en présence de DARPin (Designed Ankyrin Repeat Proteins), molécules aidant à la cristallisation de protéines membranaires et le passage à des groupes C2, P1 et P2₁2₁2₁ ont permis d'améliorer la résolution à 2,8 Å et de mettre en évidence une déviation de 2,4 Å de la chaîne polypeptidique notamment au niveau du domaine d'entrée. Les ligands co-cristallisés (doxorubicine et minocycline) ne se lient plus que sur un seul protomère dans une poche aromatique située au niveau de feuillet β des domaines PN2 et PC1. Ce protomère a été ainsi qualifié de « binding protomer ». Il présente une modification de l'hélice centrale de PN1 qui s'incline de 15° par rapport aux autres protomères, bloquant ainsi la poche au niveau du pore alors que le côté périplasmique reste ouvert. Lorsque l'ouverture s'inverse (côté périplasmique fermé et pore ouvert) l'extrusion du substrat, est rendue possible. Ce protomère ne contenant aucune molécule est donc désigné comme l' « extrusion protomer ». Le dernier protomère, qui ne contient pas de substrat, a son pore bouché et une ouverture périplasmique resserrée. Il correspondrait à un protomère au repos, en attente d'un prochain substrat d'où son nom d' « access protomer » (Fig. 28A). En ce qui concerne le vestibule, on remarque qu'il est ouvert sauf dans le cas de l'extrusion, prouvant

que le pore et le vestibule ne peuvent s'ouvrir de manière concomitante. Il est vraisemblable que la fermeture du vestibule génère des changements conformationnels poussant le substrat à sortir du transporteur.

Ces structures confirment l'hypothèse émise précédemment concernant le relai de protons puisqu'on peut noter que la Lysine 940 forme des ponts salins avec les Aspartates 407 et 408 dans les protomères « Access » et « Binding » alors qu'elle se ré-oriente vers la Thr 978 dans le protomère « Extrusion » (Fig. 29). Une communication semble donc bien exister entre le domaine transmembranaire et le domaine périplasmique (Fig. 28B).

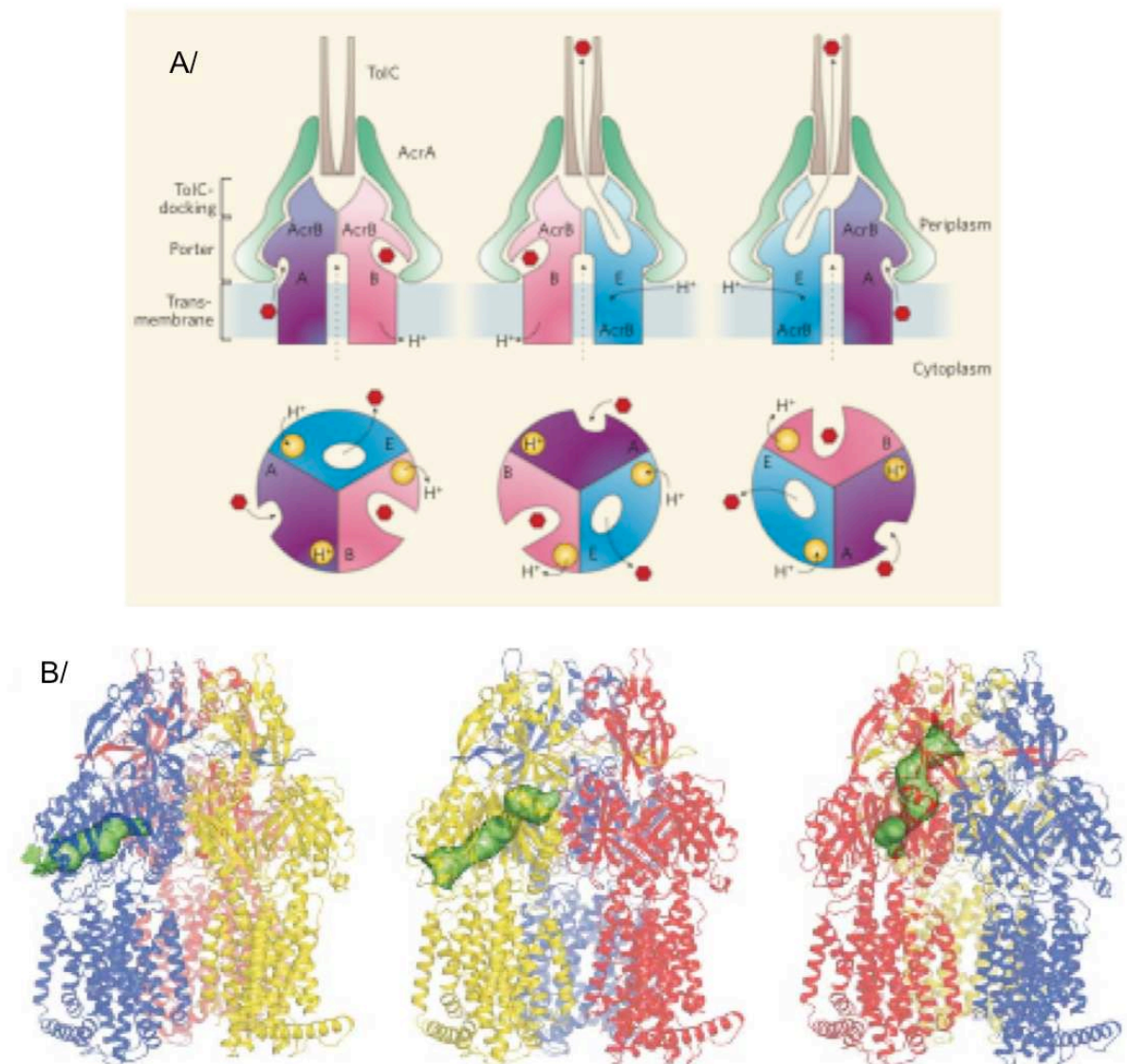


Fig. 28: Schéma du mécanisme de pompe péristaltique d'AcrB

(A) Représentation du mécanisme de pompe péristaltique d'AcrB en vue latérale et transversale (Violet = protomère « Access », Rose = protomère « Binding », Rouge = protomère « Extrusion ») (Schuldiner 2006). (B) Vue de l'évolution de la cavité périplasmique au sein de chaque monomère (Bleu=Access, Jaune=Binding, Rouge=Extrusion) (Seeger, Schiefner et al. 2006).

Afin de confirmer la validité du modèle présenté via ces structures cristallographiques, des expériences *in vivo* ont été menées après introduction par mutagenèse dirigée de cystéines sur des résidus aux interfaces des domaines ou tout le long du chemin supposé des substrats (Seeger, von Ballmoos et al. 2008; Husain and Nikaido 2010). Elles ont notamment mis en

évidence 25 résidus impliqués dans le transport, de la fente à l'extrémité de l'entonnoir. De plus, d'après toutes ces études, il semblerait que les substrats ne puissent être capturés que de la membrane et pas directement depuis le cytoplasme. Cependant, Das, Xu *et al.* (2007) ont montré que la sélectivité des substrats à extruder s'exerçait visiblement grâce à la partie N-terminale d'AcrB (Das, Xu *et al.* 2007). C'est ce que révèle leur nouvelle structure, dans laquelle les premiers résidus de la protéine apparaissent pour la première fois, structurés sous la forme d'une hélice qui va réduire le diamètre d'ouverture de la cavité centrale à 15 Å du côté cytoplasmique (Fig. 30). Ainsi, les molécules pourraient entrer de manière passive jusque dans la cavité périplasmique avant d'être prises en charge par le mécanisme de pompe péristaltique.

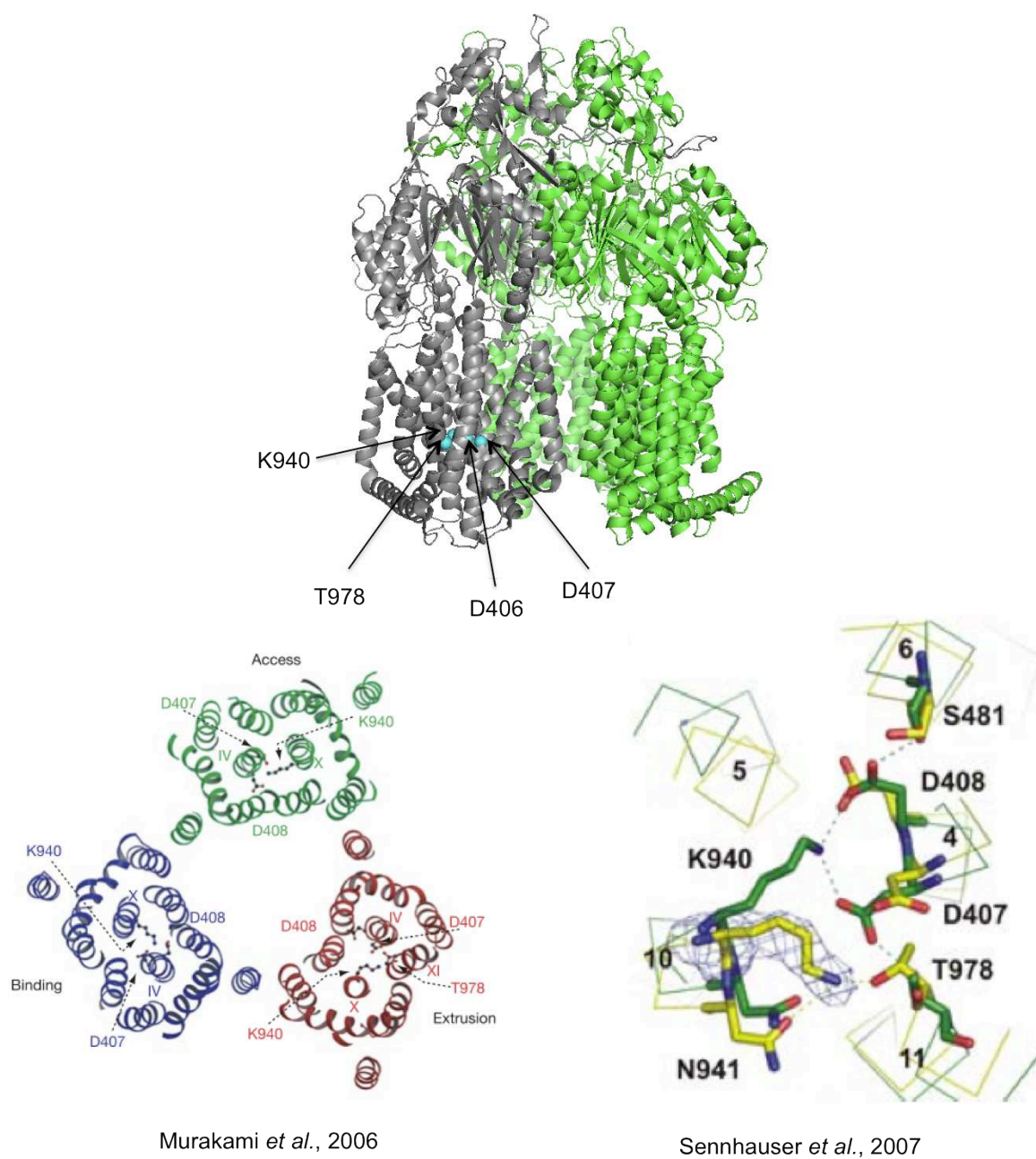


Fig. 29: Représentation des modifications conformationnelles des acides aminés impliqués dans le relai de proton au niveau du domaine transmembranaire d'AcrB

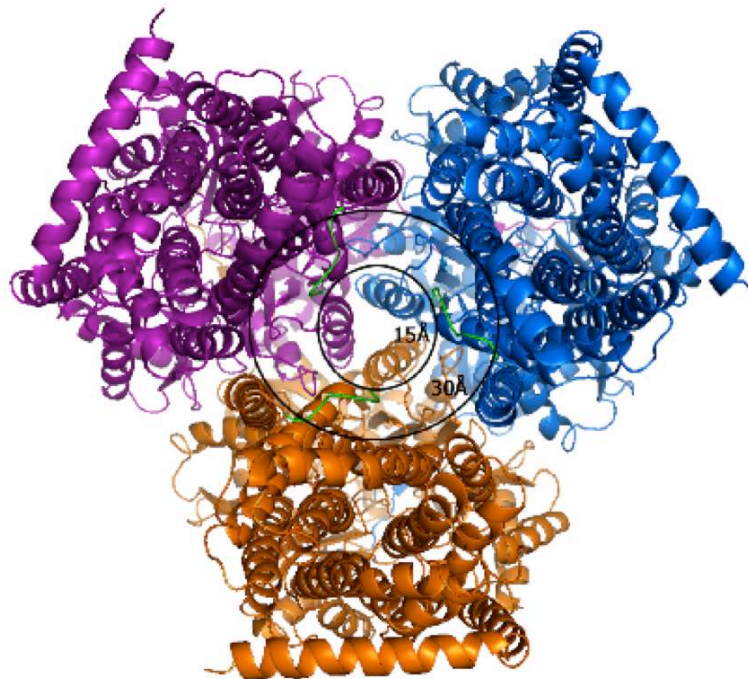


Fig. 30: Vue de la face cytoplasmique du trimère d'AcrB (Das, Xu et al. 2007)

Le diamètre externe de 30 Å correspond à la taille de l'entrée cytoplasmique décrite dans les premières structures d'AcrB dans le groupe d'espace R32. La nouvelle structure laisse apparaître l'extrémité N-terminale du transporteur représentée en vert qui réduit le diamètre de la cavité d'entrée à 15 Å.

7.2. La porine de la membrane externe

7.2.1. Structure globale

Plusieurs structures de porines de bactéries ont été résolues par cristallographie : TolC d'*E. coli*, OprM de *Pseudomonas aeruginosa* et VceC chez *Vibrio cholerae* (Koronakis, Sharff et al. 2000; Akama, Kanemaki et al. 2004; Federici, Du et al. 2005). Toutes ces structures présentent une architecture très similaire bien que le pourcentage d'identité de séquence soit relativement faible. Ces porines correspondent à l'assemblage de trois monomères formant un long canal inséré dans la membrane externe et qui se prolonge dans l'espace périplasmique. La partie membranaire du trimère forme un tonneau β de 40 Å d'épaisseur alors que la partie périplasmique s'organise en un tonneau allongé d'hélices α de 100 Å de long (Fig. 31A).

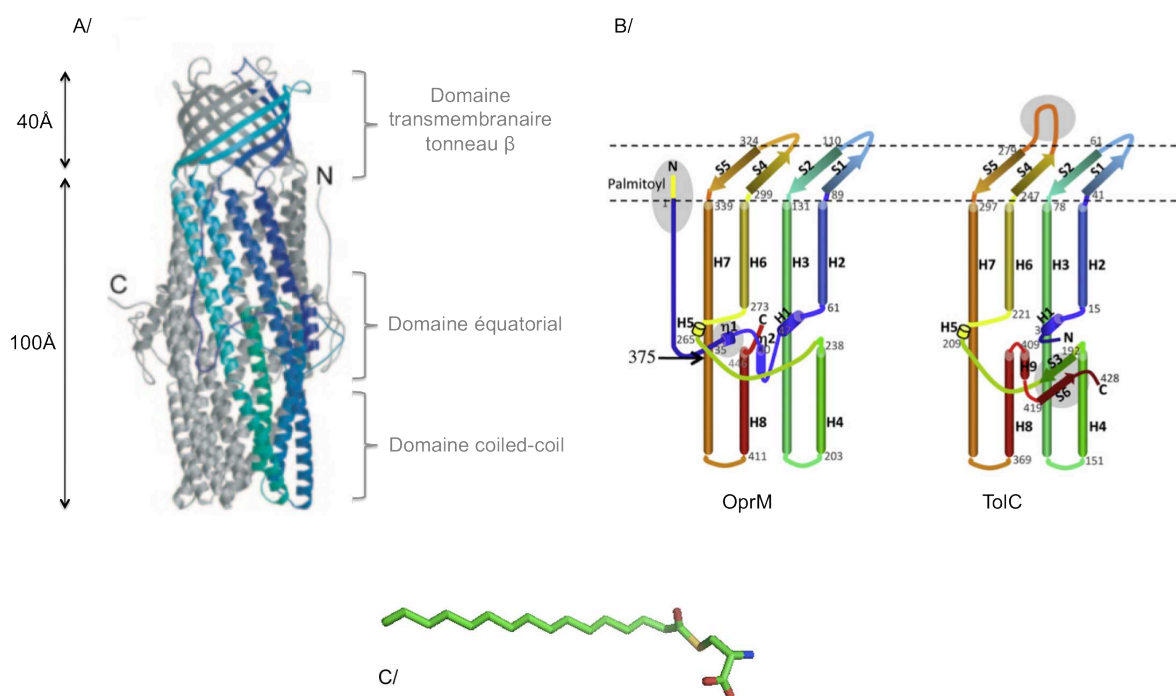


Fig. 31: Structures de la protéine de la membrane externe (OMF)

(A) Structure en rubans du trimère d'OprM. Un des monomères est représenté en dégradé de bleu (Akama, Kanemaki et al. 2004). (B) Représentation topologique d'un monomère d'OprM et de TolC (Phan, Benabdelhak et al. 2010) (C) Représentation d'un palmitate lié à la cystéine que l'on retrouve en position N-terminale d'OprM.

La structure en tonneau β est classique pour les porines de la membrane externe des bactéries Gram négatif, mais les porines de la famille de TolC présentent la particularité d'avoir un pore formé des trois protomères et non pas un pore par monomère comme c'est le cas par exemple pour OmpF. En outre, de larges boucles extracellulaires viennent coiffer l'extrémité supérieure. Si l'on se focalise sur un monomère, le domaine périplasmique comprend quatre structures hélicoïdales inclinées par rapport à l'axe principal de la protéine (Fig. 31A) : 2 longues hélices et deux structures composées chacune de deux hélices α provenant de segments éloignés sur la séquence primaire de la protéine mais disposées sur un même axe. De plus, cette zone médiane de cassure comporte trois petites hélices et de grandes boucles (Fig. 31B) qui vont former une sorte de bouée centrale nommée domaine équatorial. C'est au niveau de ce domaine que s'exerce la flexibilité de la protéine. Le domaine situé juste au dessous est appelé domaine coiled-coil et sert à l'interaction avec la protéine RND. Il comprend deux

ceintures d'hélices, une interne formée par les hélices H4 et H8 et une externe formée des hélices H3 et H7. Bien que les structures soient très similaires, il existe quelques différences entre TolC et OprM. Tout d'abord la partie N-terminale d'OprM est beaucoup plus longue et présente un palmitate (Fig. 31C) à son extrémité qui offre un deuxième ancrage de la protéine à la membrane externe. De plus, au niveau du domaine équatorial, on trouve une hélice supplémentaire chez OprM et un feuillet β supplémentaire chez TolC. Enfin, sur une vue transversale, le domaine transmembranaire d'OprM a une forme triangulaire alors qu'il est plutôt cylindrique chez TolC.

7.2.2. Ouverture de la porine

Les structures de ces différentes porines de pompes d'efflux présentent la particularité d'avoir leurs deux extrémités fermées, c'est à dire incompatibles avec le passage de substrats (Fig. 32A). Il est donc probable que les deux autres partenaires soient nécessaires pour induire l'ouverture. Koronakis, Sharff *et al.* (2000) ont proposé un mécanisme d'ouverture de type diaphragme photographique permettant de détordre les hélices au niveau du domaine coiled-coil. Une analyse en modes normaux réalisée au laboratoire (Phan, Benabdelhak *et al.* 2010) a révélé que l'association d'un mouvement de twist et d'extension permettrait d'ouvrir la porine à un diamètre de 30 Å tout le long du canal (Fig. 32B). De plus, plusieurs résidus ont été caractérisés comme responsables de la fermeture périplasmique à travers les liaisons hydrogènes et ponts salins qu'ils forment ensemble. Ces résidus diffèrent entre OprM et TolC mais ont un même objectif : rigidifier les interactions entre les hélices internes et externes ou entre monomères.

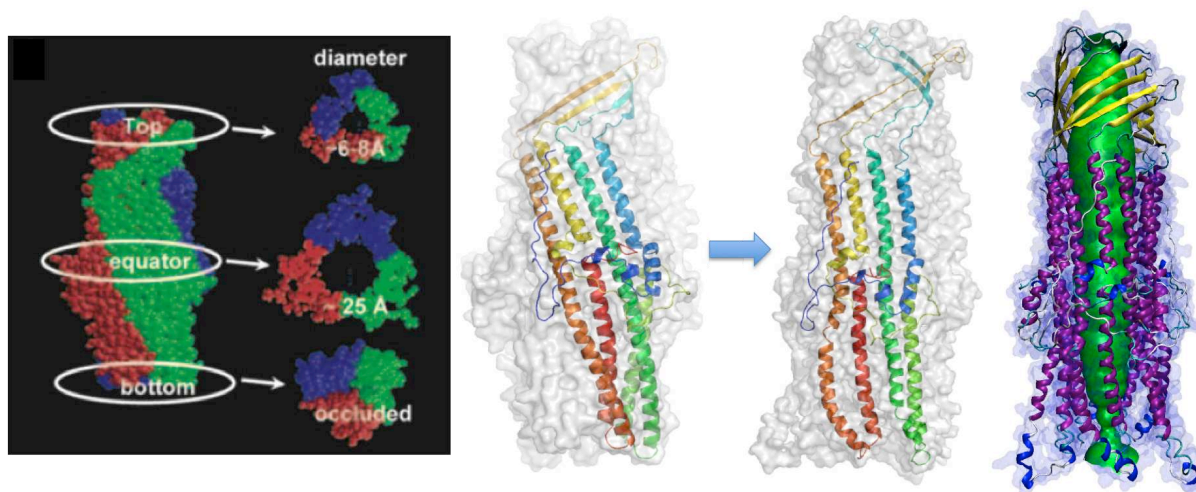


Fig. 32: Modélisation du niveau d'ouverture de la porine

(A) Coupe transversale d'OprM illustrant les diamètres du pore tout au long du canal (Akama, Kanemaki et al. 2004). (B) Analyse en modes normaux de l'ouverture d'OprM (Phan, Benabdelhak et al. 2010).

Afin de valider l'importance de ces résidus, des expériences de mutagenèse dirigée et d'électrophysiologie ont été menées.

Sur TolC tout d'abord, par des mesures d'électrophysiologie réalisées sur la forme sauvage et sur le mutant D371A-D374A, il a été montré que la porine était un canal sélectif vis à vis des cations et ceci par l'intermédiaire d'une couronne de charges négatives formée par les acides aminés D371 et D374 (Fig. 33A) (Andersen, Hughes et al. 2002; Andersen, Koronakis et al. 2002). La rupture par mutagenèse de trois liaisons inter- ou intra- moléculaires (D153A-Y362 entre H4 et H7 intramonomère, R367S-D153A' et R367S-T152V' entre H4 et H8' intermonomères) (Fig. 33B) a induit une augmentation d'un facteur six de la conductance (500 pS au lieu de 80 pS) au sein du canal par rapport à la protéine TolC sauvage, reflétant une plus grande ouverture. L'association des mutations R367S et Y362F éliminant les liaisons I et III permet même d'obtenir une conductance comprise entre 800 et 1000 pS (Fig. 33C) (Andersen, Koronakis et al. 2002). Une expérience inverse, visant à bloquer le mouvement des hélices par l'introduction de cystéines, a confirmé, par électrophysiologie et complémentarité dans une souche d'*E. coli* délétée de TolC, l'importance de l'ouverture des hélices pour l'efflux des antibiotiques. En effet, si un pont disulfure entre les hélices H4 et

H7 intermonomères (A159C-S350C) réduit d'un facteur cinq l'export de l'hémolysine, celui ci est totalement aboli lorsque les hélices H4 et H8' ou les Asp374C sont pontées (Eswaran, Hughes *et al.* 2003). Toutefois, ces mutants gardent la capacité d'interagir avec leurs partenaires, ce qui suggère que le mouvement des hélices est primordial pour l'efflux de molécules. L'importance des résidus D374 ainsi que D371 a été confirmée par une étude biochimique et structurale de la porine en présence d'hexaminocobalt. Ce ligand présente une affinité de 20 nM pour TolC et interagit avec les résidus aspartates D374 à l'entrée du pore périplasmique, formant un bouchon (Fig. 34). Plus récemment, plusieurs études couplant complémentation, détermination structurale et mesures d'électrophysiologie sur de nouveaux mutants de TolC (Y362F et/ou R637E) ont complété les connaissances acquises sur le mécanisme d'ouverture de la porine (Higgins, Eswaran *et al.* 2004; Bavro, Pietras *et al.* 2008; Vaccaro, Scott *et al.* 2008; Schulz and Kleinekathofer 2009; Pei, Hinchliffe *et al.* 2011). Bavro, Pietras *et al.* ont notamment observé l'apparition d'une crevasse au sein du mutant qui pourrait correspondre à la région d'interaction avec AcrA.

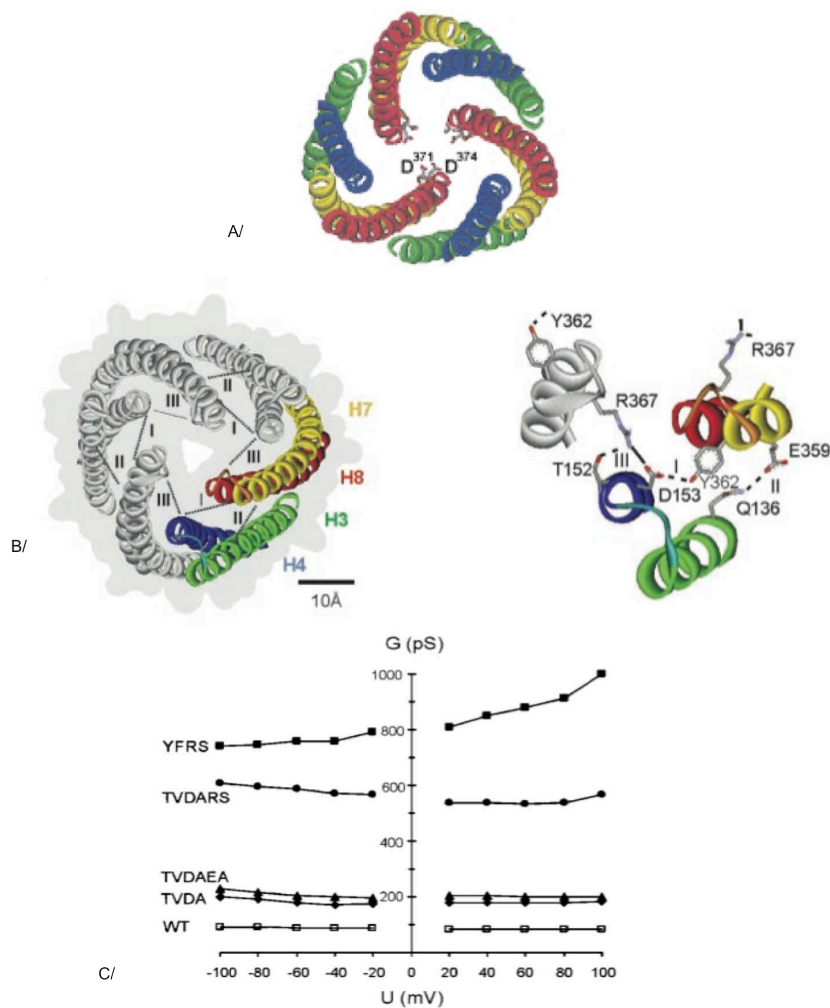


Fig. 33: Constriction périplasmique de TolC

(A) Vue de l'extrémité périplasmique de TolC. Les quatre hélices α de chaque protomère sont représentées en vert (H3), en bleu (H4), en jaune (H7) et en rouge (H8). Six résidus aspartates, les D371 et D374 de chaque monomère forment la constriction périplasmique de TolC. (B) Représentation des liaisons intramonomères (I et II) et intermonomères (III) impliquées dans la constriction périplasmique de TolC. Le pont salin est représenté en trait plein et les liaisons hydrogènes en pointillés. (C) Mesure de la conductance au sein du canal TolC pour la forme sauvage et différents mutants de la constriction en fonction du potentiel appliqué (Andersen, Koronakis et al. 2002; Andersen, Koronakis et al. 2002).

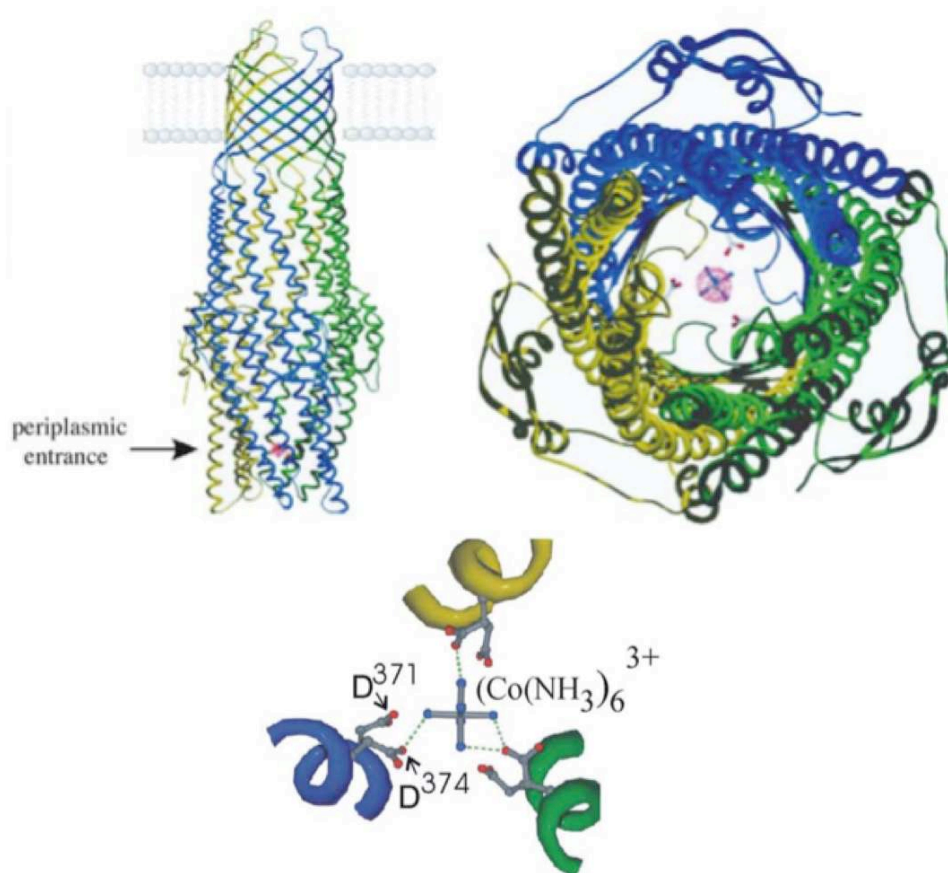


Fig. 34: Structure de TolC en présence d'hexamine cobalt (Higgins et al. 2004)

Visualisation du site de fixation de l'hexamine cobalt sur TolC sur une vue parallèle (A) ou perpendiculaire à la membrane (B/). Les monomères sont représentés en bleu, vert et jaune. (C/) Vue périplasmique du site de liaison de l'hexamine cobalt sur la couronne d'Asp374.

Si l'étude de l'ouverture de TolC semble avoir fait de grands pas, très peu de données sont disponibles sur OprM. Seule l'analyse en modes normaux réalisée au laboratoire (Phan, Benabdelhak et al. 2010) a montré l'importance des résidus « cadenas » qui ferment l'extrémité de la porine (D416-R419, D205-Y404, D409-R403 et L412) (Fig. 35). Bien que ces résidus se situent globalement dans la même zone que ceux dont l'importance a été démontrée chez TolC, ils mettent en jeu des liaisons différentes : OprM ne possède que des liaisons intramoléculaires entre H7 et les hélices internes. Par contre, il présente un pont salin intermoléculaire au lieu de l'anneau de six aspartates (D371 et D374 de chaque protomère) présent chez TolC. Il est donc primordial d'étudier plus en détails la fonctionnalité d'OprM par des approches similaires à celles développées sur TolC,

pour mieux comprendre le fonctionnement de l'efflux par la pompe OprM-MexAB ; c'est ce que nous avons fait au cours de cette thèse.

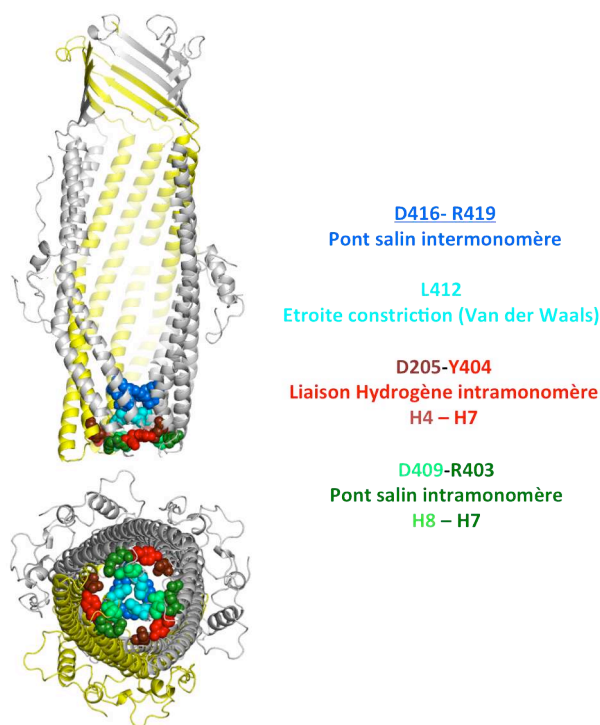


Fig. 35: Représentation des résidus impliqués dans la constriction périplasmique d'OprM

7.3. La protéine de fusion périplasmique (MFP)

7.3.1. Structure

Plusieurs structures de MFP ont été résolues à ce jour. C'est le cas de MexA de *Pseudomonas aeruginosa* (Akama, Matsuura *et al.* 2004; Higgins, Bokma *et al.* 2004) et de son homologue d'*E. coli*, AcrA (Mikolosko, Bobyk *et al.* 2006). On trouve également des structures de CusB d'*E. coli* qui fonctionne avec CusC et CusA dans l'expulsion d'atomes lourds (Cu^{2+} , Ag^{2+}) (Su, Yang *et al.* 2009), de MacA d'*E. coli* qui fonctionne avec TolC et MacB pour le transport des macrolides (Yum, Xu *et al.* 2009) ou encore de ZneB de *Cupriavidus metallidurans* qui fonctionne avec ZneA et ZneC pour l'efflux de métaux lourds tels que le zinc (De Angelis, Lee *et al.* 2010) (Fig. 36). Toutefois, comme toutes ces MFP présentent une architecture en 4 domaines très proches, leur description structurale ne sera détaillée que pour MexA et AcrA.

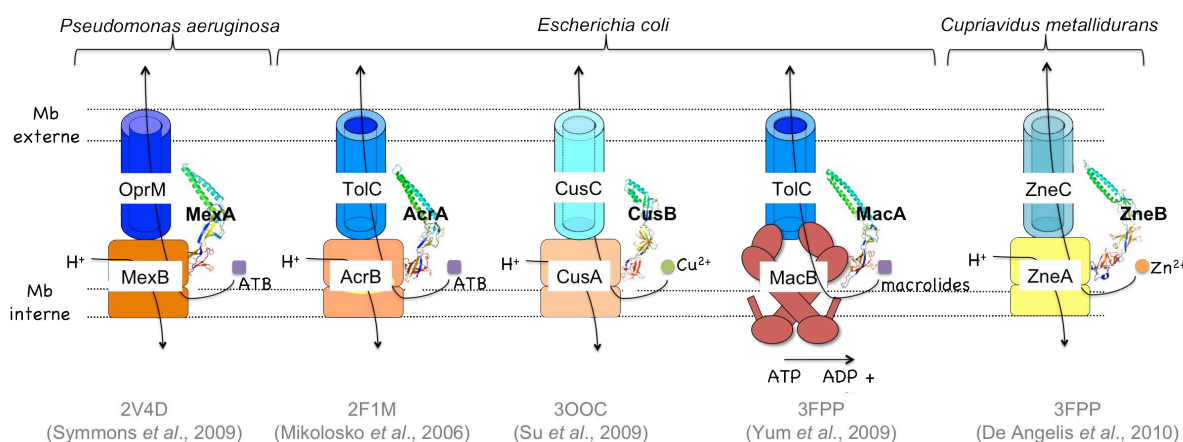


Fig. 36: Représentation schématique de différents systèmes d'efflux

Les structures cristallographiques des MFP (MexA, AcrA, CusB, MacA et ZneB) sont représentées sous leur forme monomérique en rubans. Les transporteurs RND (MexB, AcrB, CusA et ZneA) ou ABC (MacB) ainsi que les protéines OMF (OprM, TolC, CusC et ZneC) associées sont représentées sous forme schématique.

MexA est considérée comme hydrosoluble car localisée dans le périplasme mais elle possède un ancrage à la membrane cytoplasmique via un palmitoyl acylé greffé sur sa cystéine N-terminale. Son rôle semble accessoire pour le mécanisme d'efflux mais interviendrait plutôt pour la localisation cellulaire de la protéine

(Zgurskaya and Nikaido 1999; Yoneyama, Maseda *et al.* 2000). Après l'ajout du palmitate, la protéine subit une maturation qui enlève les 22 premiers acides aminés en amont de la cystéine ; c'est cette forme mature, numérotée à partir de la cystéine, qui est présentée dans les différentes figures. Seule une version soluble dépourvue de la modification N-terminale a pu être cristallisée. Cette protéine de forme allongée (90 Å de long) comporte quatre domaines : un domaine α -hairpin composé de deux hélices en épingle à cheveu, un domaine β formé de deux fois quatre feuillets β qualifié de « domaine lipoyl », un tonneau β (ou « β -barrel ») lié à une hélice α et enfin un domaine « membrane proximal » constitué uniquement de feuillets β , mis au jour après ré-affinement de la structure par Symmons, Bokma *et al.* (2009) (Fig. 37). Au sein de l'unité asymétrique, MexA apparaît sous forme de 13 molécules organisées en deux fers à cheval disposés tête bêche et interagissant au niveau du domaine en hélices (Fig. 38A). AcrA adopte un empilement cristallin totalement différent puisqu'elle apparaît sous forme d'un dimère de dimère (Fig. 38B). Les différences entre les deux protéines ne s'arrêtent pas là puisque le domaine « membrane proximal » d'AcrA n'est pas visible dans la structure (car il s'agit d'une version tronquée de la protéine qui a été cristallisée après protéolyse ménagée) et d'autre part, la boucle reliant les deux hélices du domaine α -hairpin comporte treize acides aminés de plus que celle de MexA, ce qui doit avoir une incidence sur son interaction avec la protéine OMF. Enfin, une étude de dynamique moléculaire menée sur MexA a montré que cette protéine possédait une grande flexibilité, en exerçant un mouvement de pince dont la charnière se situerait entre le domaine α -hairpin et le domaine β (Vaccaro, Koronakis *et al.* 2006).

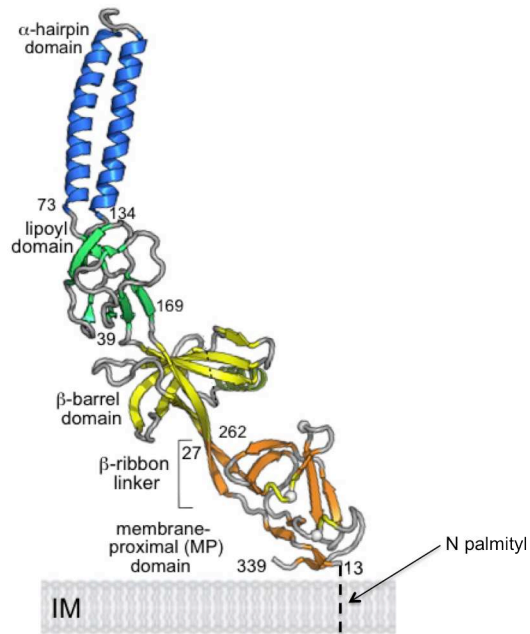


Fig. 37: Représentation tridimensionnelle d'un monomère de MexA

(Symmons, Bokma *et al.* 2009)

Le domaine α -hairpin est colorié en bleu, le domaine lipoyl en vert, le domaine β en jaune et le domaine membrane proximal en orange. L'ancrage lipidique à la membrane, non visible sur la structure cristallographique est représenté en pointillé. Le numéro des acides aminés délimitant chaque domaine est indiqué.

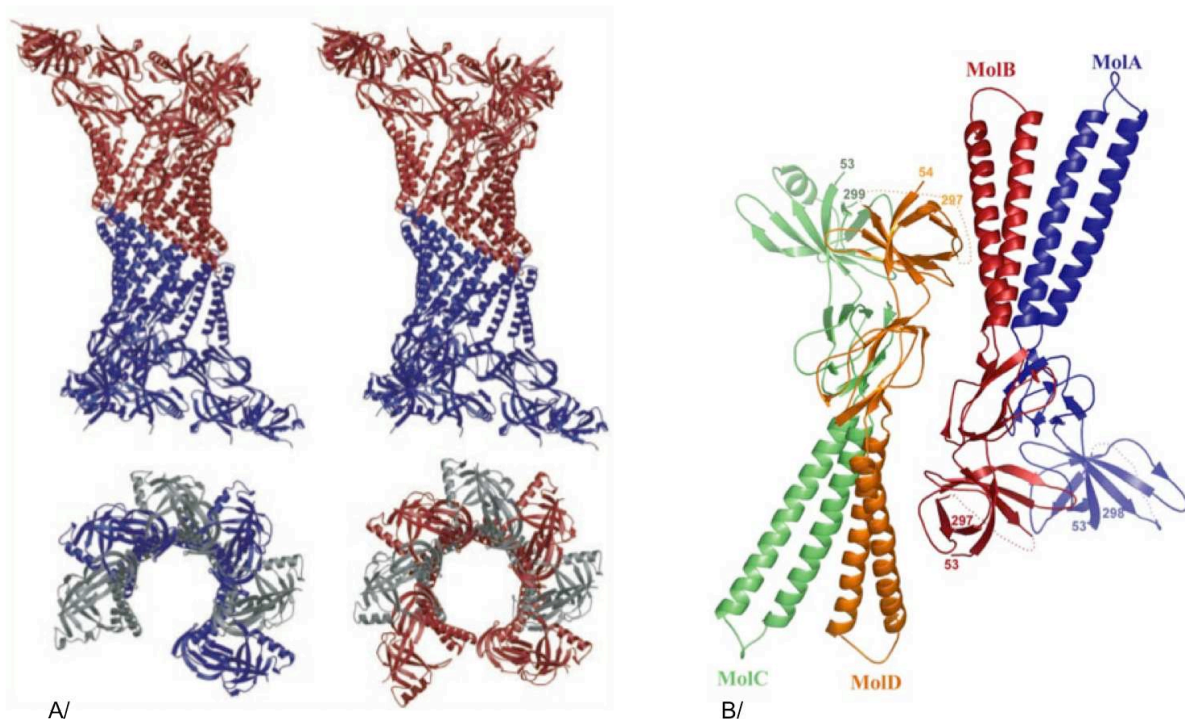


Fig. 38: Packing cristallin de MexA et AcrA dans leur unité asymétrique

(A) L'heptamère et l'hexamère de MexA compris dans l'unité asymétrique sont respectivement colorés en rouge et bleu, avec une alternance couleur/gris entre chaque monomère sur la vue transversale (Akama, Matsuura et al. 2004). (B) Représentation en rubans des deux dimères d'AcrA visibles dans l'unité asymétrique (Mikolosko, Bobyk et al. 2006).

7.3.2. Oligomérisation

S'il est clairement admis que les protéines RND et OMF sont fonctionnelles uniquement sous forme trimérique, le niveau d'oligomérisation de la MFP reste controversé. En effet, bien que tous les modèles proposés respectent une symétrie 3, les structures cristallographiques de MexA semblent montrer que l'on pourrait assembler jusqu'à 9 (Higgins, Bokma et al. 2004) voire 12 (Akama, Matsuura et al. 2004) molécules de MexA autour du complexe OMF-RND. Toutefois ces mêmes auteurs ont montré que les MFP sont monomériques *in vitro*. Des expériences de pontage *in vivo* révèlent quant à elles, que ces protéines se comportent comme des trimères (Zgurskaya and Nikaido 2000; Nehme, Li et al. 2004). De plus, le pH semble être un élément déterminant dans l'oligomérisation des MFP. Ainsi Ip, Stratton et al. (2003) ont montré, par résonance paramagnétique électronique qu'un pH acide promouvait l'oligomérisation d'AcrA.

Les monomères s'organisent alors parallèlement les uns aux autres (Ip, Stratton *et al.* 2003). L'Histidine 285 d'AcrA semble être un élément clé de cette oligomérisation pH-dépendante (Wang, Weng *et al.* 2012). De même, MexA passerait d'un état dimérique à une forme hexamérique lorsque le pH passe de 7,5 à 5,5 (Reffay, Gambin *et al.* 2009). Si la tendance penche donc vers l'oligomérisation de la MFP, il semble important à présent que les études clarifient le nombre de molécules de cette protéine au sein des complexes bi- et tripartites qu'elle forme avec ses partenaires.

7.4. L'assemblage

7.4.1. Interchangeabilité des partenaires

De nombreux efforts ont été faits pour obtenir une structure du complexe tripartite mais en vain jusqu'à ce jour. Cependant, afin de mieux comprendre comment interagissent les trois partenaires et quels éléments régissent la spécificité de chaque pompe, de nombreuses approches ont été développées. Une première approche consiste à étudier des pompes chimériques, correspondant à l'association d'un ou deux éléments d'une pompe avec ceux d'une autre pompe afin de reconstituer une pompe « hybride » et de regarder si elle est fonctionnelle du point de vue de la sensibilité aux antibiotiques. Ainsi, chez *Pseudomonas aeruginosa*, OprM est capable de remplacer OprJ avec MexCD ou OprN avec MexEF. En revanche si inversement OprJ peut se substituer à OprM, ce n'est pas le cas pour OprN. De plus, la protéine RND (associée à la MFP) semble être responsable de la spécificité de la pompe, MexB ne pouvant être remplacé ni par MexD ni par MexF pour fonctionner avec MexA-OprM (Srikumar, Li *et al.* 1997; Gotoh, Tsujimoto *et al.* 1998; Yoneyama, Ocaktan *et al.* 1998; Maseda, Yoneyama *et al.* 2000). Des études similaires ont été réalisées en intervertissant les composants de pompes d'organismes différents. Ainsi, il a été montré que TolC d'*E. coli* pouvait fonctionner avec VceAB de *Vibrio cholerae* mais inversement VceC ne peut pas remplacer TolC bien que l'assemblage avec les partenaires d'*E. coli* soit possible. En revanche, TolC n'interagit pas avec MexAB de *Pseudomonas aeruginosa* mais restaure une résistance aux antibiotiques dans le

cadre d'une chimère TolC-AcrA-MexB (Vediyappan, Borisova *et al.* 2006; Welch, Awah *et al.* 2010). Par ailleurs, bien qu'OprM puisse interagir avec AcrAB d'*E. coli*, la pompe formée n'est pas fonctionnelle (Tikhonova, Wang *et al.* 2002; Stegmeier, Polleichtner *et al.* 2006).

Lorsque la pompe chimérique formée n'est pas fonctionnelle, une deuxième approche visant à trouver des mutants « gain de fonction » est mise en place. Elle permet ainsi de mettre au jour les résidus de contacts entre MFP et OMF ou MFP et RND.

7.4.2. Les interactions MFP-OMF

Une interaction directe entre TolC et AcrA, indépendante de la présence de substrat ou d'AcrB, a tout d'abord été mise en évidence par des expériences de pontage *in vivo* (Husain, Humbard *et al.* 2004). De plus, une étude par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) (Tikhonova, Dastidar *et al.* 2009) a révélé trois éléments importants pour l'interaction de TolC avec différentes MFP. L'association OMF-MFP est un processus dynamique qui implique deux modes de liaison présentant des K_d de 0,11 et 2,1 μ M et des durées de vie de 200s et 2s dans le cadre de l'interaction TolC-AcrA. En outre, la formation de complexes MFP-TolC est modulée par le pH puisque presque aucune interaction n'est détectée à un pH>7 alors que des complexes stables apparaissent à des pH<6. Ceci est compatible avec les conditions physiologiques, où le pH du périplasme est estimé à 6 contre 7,5 dans le cytoplasme.

Plusieurs études ont également été menées afin de décrire les acides aminés importants pour l'interaction MFP-OMF. Ainsi, il a été montré que trois résidus (Arg, Leu, Ser) strictement conservés parmi les MFP et situés dans le domaine α -hairpin sont indispensables à l'interaction d'AcrA et MacA avec TolC et donc à la fonctionnalité de la pompe (Kim, Xu *et al.* 2010; Xu, Sim *et al.* 2010). Par ailleurs, dans le cadre de la chimère non fonctionnelle MexAB-TolC, un gain de fonction a été obtenu grâce à des mutations sur TolC au niveau du domaine équatorial et au niveau de son extrémité périplasmique (V198D, I369F, D121N, Q142R et I133A) (Bokma, Koronakis *et al.* 2006) (Fig. 39). Ces mutations permettent soit de restaurer l'acide aminé naturel d'OprM (TolC V198D = OprM D253), soit de rétablir

les liaisons stabilisant les hélices périplasmiques. Une autre étude de pontage après mutagenèse en cystéine a été réalisée afin de caractériser plus précisément l'interface AcrA/TolC. Couplée à une approche par docking, ceci a permis de proposer un modèle d'interaction entre ces deux protéines (Lobedanz, Bokma *et al.* 2007). Ainsi sur TolC ces résidus sont localisés sur l'hélice H3 (S124, Q139, Q142) et à l'extrémité de l'hélice H7 (S363). Pour AcrA, ils sont situés sur la face externe de l'hélice $\alpha 1$ du domaine coiled-coil (A79, D87, R104, Q112, I114) et dans la partie N-terminale de l'hélice $\alpha 2$ (E118) (Fig. 39). Le modèle réalisé par docking montre que l' α -hairpin d'AcrA vient se loger dans un sillon intramoléculaire de TolC formé par les hélices H7/H8/H3. L'hélice $\alpha 1$ d'AcrA s'aligne parallèlement aux hélices H3 et H8 de TolC alors que l'hélice $\alpha 2$ entre en contact avec l'hélice H7. Les domaines lipoyl et β -barrel quant à eux s'orientent vers l'extérieur de l'édifice ainsi formé.

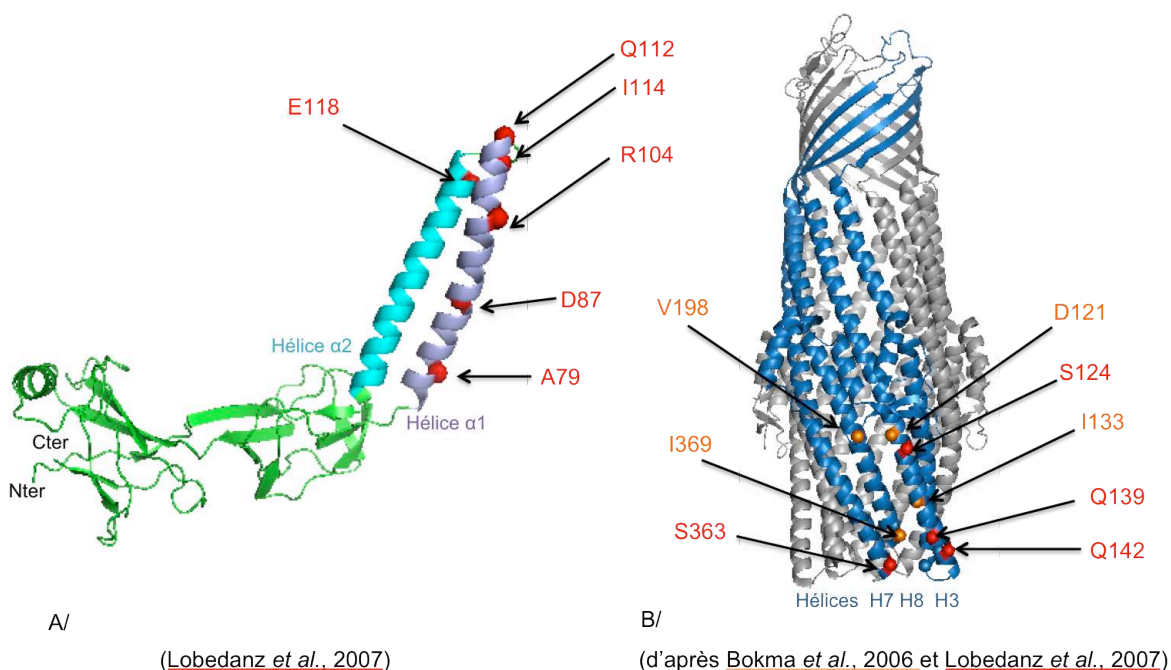


Fig. 39: Représentation des résidus impliqués dans l'interaction MFP-TolC

(A) Structure en rubans du monomère d'AcrA sur laquelle sont indiqués par des boules rouge les acides aminés interagissant avec TolC. Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du domaine α -hairpin sont colorées en violet et cyan respectivement. (B) Structure d'un trimère de TolC sur laquelle un monomère est colorié en bleu. Les acides aminés impliqués dans l'interaction avec la protéine MFP sont indiqués en rouge dans le cas d'AcrA et en orange dans le cas de MexA.

Plus récemment, un nouveau système de protéines chimères a été développé par Xu, Song **et al.** (2011). Il est né de l'observation de l'empilement de MacA au sein de son unité asymétrique, dans laquelle MacA forme deux hexamères interagissant par les domaines α -hairpin organisés en tonneau. Ainsi un tonneau α de MacA semble mimer l'extrémité périplasmique des hélices α de TolC dans sa forme ouverte (Yum, Xu *et al.* 2009). De plus MacA d'*Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa-MacA) présente l'avantage de former un hexamère stable. Le système consiste donc à remplacer l'extrémité d'Aa-MacA (résidus 124-147) par les acides aminés de l'extrémité périplasmique de TolC (résidus 136-159 ou 354-377) et tester ensuite l'interaction de cette chimère avec les MFP natives ou stabilisées sous leur forme hexamérique via une chimère Aa-MacA_MFP α -hairpin. Ce système a également été adapté pour le complexe OprM-MexA de *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant les résidus 188-212 et 639-419 de la porine et la forme stabilisée Aa-MacA_MexA α de la MFP (Fig. 40) (Xu, Moeller *et al.* 2012).

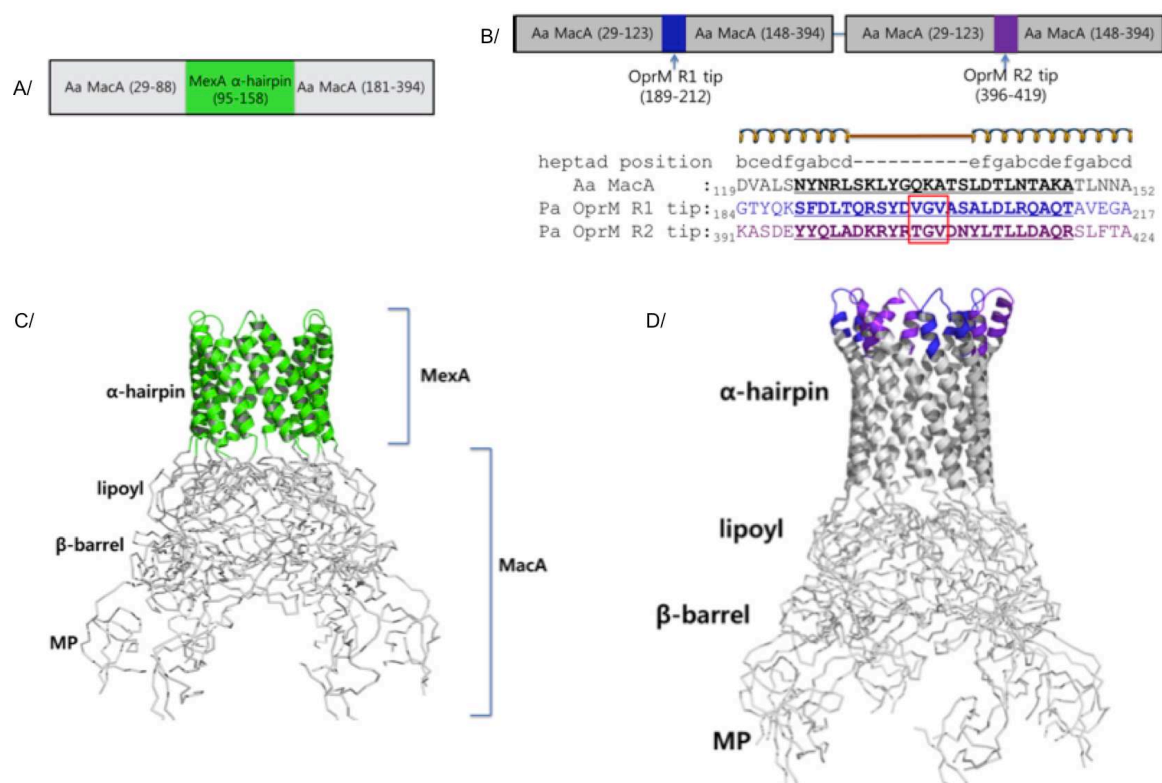


Fig. 40: Système de protéines chimères fabriquées à partir de la protéine MacA d'*A. actinomycetemcomitans* (Xu, Moeller et al. 2012)

(A/) Diagramme schématique de la construction de la chimère Aa-MacA_MexA. (B/) Diagramme schématique de la construction de la chimère Aa-MacA_OprM. (C/) Structure hexamérique de la chimère Aa-MacA_MexA. Le domaine α hairpin de MexA est représenté en vert et les domaines lipoyl, β barrel et membrane proximal de MacA en gris. (D/) Modélisation de la chimère Aa-MacA_OprM. Les extrémités péripasmiques des deux paires d'hélices d'OprM sont représentées en bleu et violet.

Les deux études montrent que l'interaction MFP-OMF se fait par simple contact des extrémités α péripasmiques des deux protéines. En effet, les extrémités péripasmiques de chaque protéine adoptent une forme de roue crantée, qui s'emboîtent parfaitement pour former le complexe bipartite (Fig. 41A). La structure du complexe chimérique OprM-MexA, modélisée dans la carte de microscopie électronique, permet de préciser les acides aminés liant les deux protéines à travers une vingtaine de contacts. Les trois acides aminés Arg119, Leu123 et Ser130 de MexA, conservés chez les MFP, sont notamment engagés dans des contacts avec OprM (Fig. 41B) : une liaison hydrogène s'établit entre le groupement guanidinium de MexA-Arg119 et une fonction carbonyle du squelette peptidique d'OprM-Gly195 ou d'OprM-Gly407, une autre est observée entre MexA-

Ser130 et OprM-Ser138 ou son équivalent dans le motif répété 2 (OprM-Asn410), une interaction hydrophobe se crée entre MexA-Leu123 et les Valines 201 ou 408 d'OprM appartenant au motif conservé Val/Thr-Gly/Val des OMF. D'autre part, parmi les 18 interactions polaires observées entre MexA et OprM on peut citer un pont salin formé entre MexA-Asp126 et OprM-Arg190 ou OprM-Lys402.

Enfin, ce système de protéines chimériques semble montrer que l'hexamérisation de la MFP est nécessaire pour favoriser une liaison de forte affinité avec la protéine OMF, liaison qui pourrait être facilitée *in vivo* grâce au peptidoglycane.

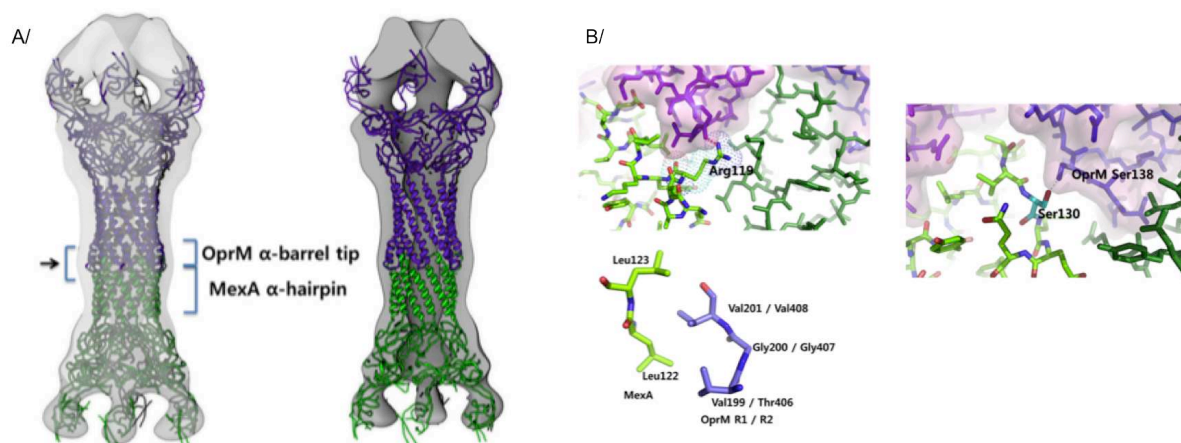


Fig. 41: Système de protéines chimères fabriquées à partir de la protéine MacA d'*A. actinomycetemcomitans* (Xu et al., 2011)

(A) Structures des chimères Aa-MacA_MexA et Aa-MacA_OprM modélisées dans la carte de densité obtenue par microscopie électronique. (B) Visualisation des interactions formées entre OprM et les résidus Arg119, Leu123 et Ser130 de MexA, conservés chez les MFP.

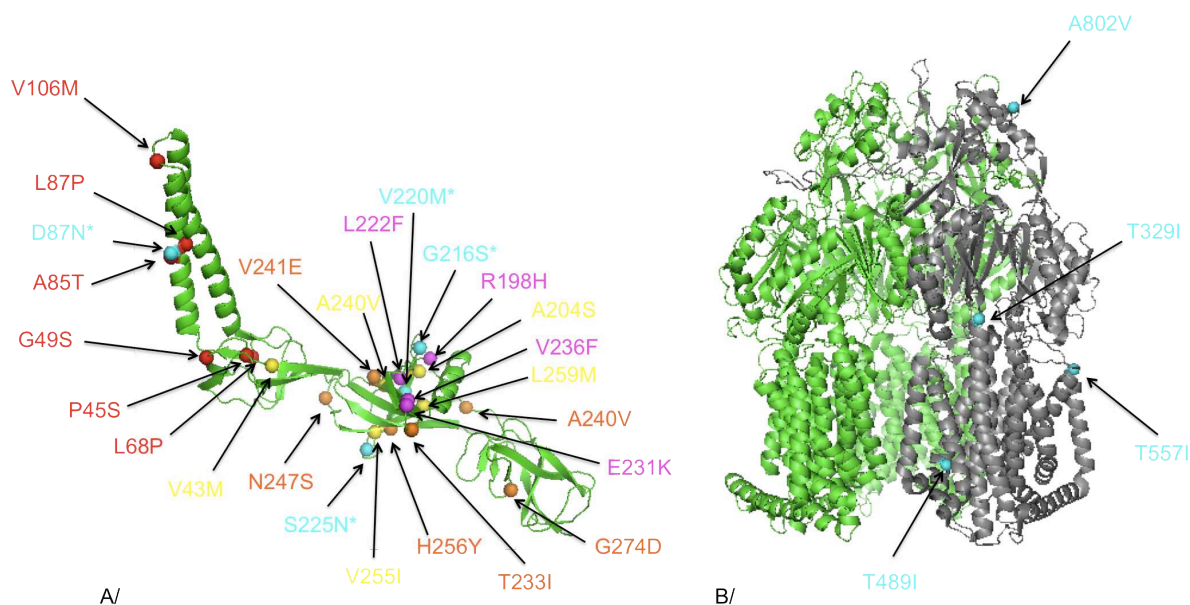
7.4.3. Les interactions MFP-RND

Si l'interaction OMF-MFP fait intervenir le domaine α -hairpin de la MFP, l'ensemble de la protéine semble impliqué dans le cadre de l'interaction MFP-RND. (Kawabe, Fujihira et al. 2000; Elkins and Nikaido 2003; Nehme, Li et al. 2004; Touze, Eswaran et al. 2004; Nehme and Poole 2005).

En effet, les mutations « perte de fonction » de MexA vis à vis de l'interaction avec MexB se regroupent en deux clusters : P45S, G49S, L68P, A85T, L87P et V106M dans les domaines "lipoyl" et " α -hairpin" N-terminaux et T233I, V241E, N247S,

H256Y, V263A et G274D dans les domaines "β-barrel" et "membrane proximal" C-terminaux (Fig. 42). Parmi elles, G49S, V106M, T233I et G274D entraînent un défaut de multimérisation de la MFP (Nehme, Li *et al.* 2004). D'autre part, trois des quatre mutants de MexA suppresseurs du phénotype "MexB_{T578I} sensible" sont localisés dans le domaine "β-barrel" de la MFP (R198H, L222F, E231K, V236I) (Nehme and Poole 2005). Les suppresseurs du phénotype "MexB_{G220S} sensible" sont situés quant à eux majoritairement dans le domaine "β-barrel" de la MFP (A204S, V236F, A240V, V255I et L259M), à l'exception de V43M dans le domaine "lipoyl" (Nehme and Poole 2007) (Fig. 42).

Enfin, le système hybride TolC-AcrA-MexB n'étant que partiellement fonctionnel (résistance uniquement à la Novobiocine, au SDS et au Bromure d'Ethidium), des mutations sur AcrA (D87N, G216S, V206M, S225N) et MexB (T329I, A802V, T557I, T489I) (Fig. 42 A et B) ont été créées afin d'élargir aux autres substrats de MexB la gamme de molécules prises en charge par cette pompe (Krishnamoorthy, Tikhonova *et al.* 2008). Ces mutations permettent un meilleur ajustement des partenaires au sein du complexe qui devient ainsi davantage fonctionnel.



(d'après Nehme *et al.*, 2004, 2005, 2007 et Krishnamoorthy *et al.*, 2008.)

Fig. 42: Représentation des acides aminés impliqués dans l'interaction MFP-RND

(A) Structure en rubans d'un monomère de MexA. (B) Structure en rubans de MexB sous forme trimérique. Un des monomères a été grisé. Les acides aminés « perte de fonction » de MexA décrit par Nehme, Li *et al.* (2004) sont représentés par des boules rouge et orange. Les mutants de MexA suppresseur des phénotypes MexB^{T578I} et MexB^{G220S} sensibles sont indiqués sous forme de boules rose et jaune respectivement. Enfin, les mutants « gain de fonction » permettant une meilleure accommodation entre AcrA et MexB sont coloriés en cyan sur le monomère de chaque structure.

Par ailleurs, des expériences d'ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) et de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) ont montré que l'interaction AcrA-AcrB faisait intervenir deux événements séquentiels d'association : la phase initiale est caractérisée par une constante d'association faible (10^4 M^{-1}) alors que la deuxième phase est présente une constante d'affinité plus élevée (10^6 M^{-1}). Si les deux réactions sont exothermiques ($\Delta H < 0$) cette différence s'explique par le gain entropique ($\Delta S > 0$) qui est observé uniquement dans la deuxième étape. De plus, il a été montré que l'interaction de forte affinité est favorisée par la forme palmitylée dimérique de la MFP, avec un K_d de $0,09 \mu\text{M}$ (5 à 10 fois supérieur à celui obtenu avec la forme non-palmitylée de la MFP) (Tikhonova, Yamada *et al.* 2011). En outre, la région C-terminale d'AcrA (172-397) régit l'interaction avec le transporteur RND dans ces expériences (Touze, Eswaran *et al.* 2004).

Récemment, une structure cristallographique de complexe MFP-RND a été résolue (Su, Long *et al.* 2011). Elle décrit la fixation de deux molécules de CusB (MFP) sur chaque protomère de CusA (RND) (Fig. 43).

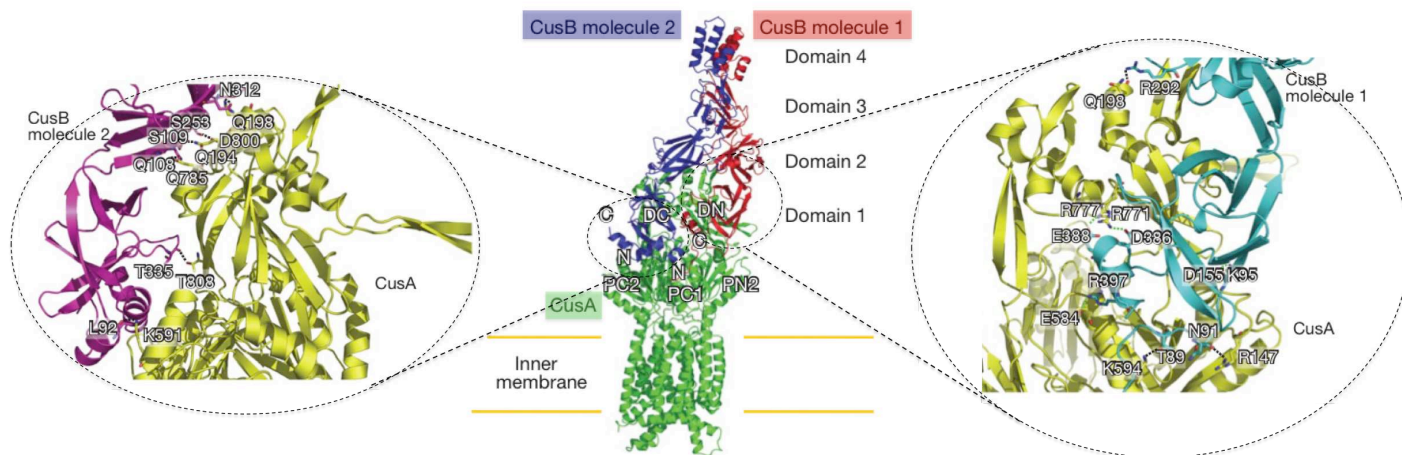


Fig. 43: Structure du complexe CusBA (Su, Long *et al.* 2011)

Au centre de l'image est présentée l'interaction entre un monomère de CusA (en vert) et deux molécules de CusB (en bleu et rouge) retrouvée au sein de l'unité asymétrique. Les zones d'interaction du transporteur RND (en jaune) avec chaque molécule de MFP (CusB-I en cyan et CusB-II en rose) sont zoomées de part et d'autre afin de mettre en évidence les acides aminés impliqués dans des liaisons hydrogène.

La première molécule de CusB (CusB-I) interagit avec les domaines PN2, PC1 et DN du transporteur via des interactions charge-charge. Ainsi, 4 ponts salins sont formés entre les résidus K95, D386, E388, R397 de CusB et D155, R771, R777 et E584 de CusA. De plus, on observe quatre liaisons hydrogène entre les résidus T89, N91, R292 de CusB-I et K594, R147 et Q198 de CusA. La seconde molécule de la protéine MFP (CusB-II) s'associe quant à elle plutôt avec les domaines PC1, PC2 et DC grâce à des interactions de type charge-dipôle ou dipôle-dipôle. Six liaisons hydrogène sont ainsi décrites entre L92, T335, Q108, S109, S253, N312 de CusB et K591, T808, Q785, Q194, D800 et Q198 de CusA. D'importantes interactions sont également visibles entre molécules voisines de CusB. Les contacts de CusB-I avec CusB-II se situent principalement entre les domaines 1 à 3 de chaque molécule ($E_{I118}-T_{II139}$, $Y_{I119}-D_{II142}$, $R_{I186}-T_{II206}$, $E_{I252}-N_{II312}$ et $R_{I292}-N_{II113}$) (Fig. 44B) alors que les liaisons entre CusB-I et CusB-VI font intervenir les domaines 2 et 3 ($N_{I113}-R_{VI292}$, $N_{I228}-A_{VI126}$, $N_{I312}-E_{VI252}$, et $D_{I142}-Y_{VI119}/R_{VI297}$) (Fig. 44C). L'hexamère ainsi formé (Fig. 44A) adopte une structure en entonnoir avec une partie

inférieure dite « cap » et une partie supérieure nommée « channel ». Le domaine cap est formé des domaines 1 et de la partie inférieure des domaines 2 des MFP et va interagir avec la protéine RND. La partie inférieure du domaine "channel" contient les tonneaux β et la partie supérieure des hélices α . Le diamètre décroît le long de la structure puis s'élargit à l'approche de la membrane externe avec un point de constriction maximale au niveau de l'acide aminé D232.

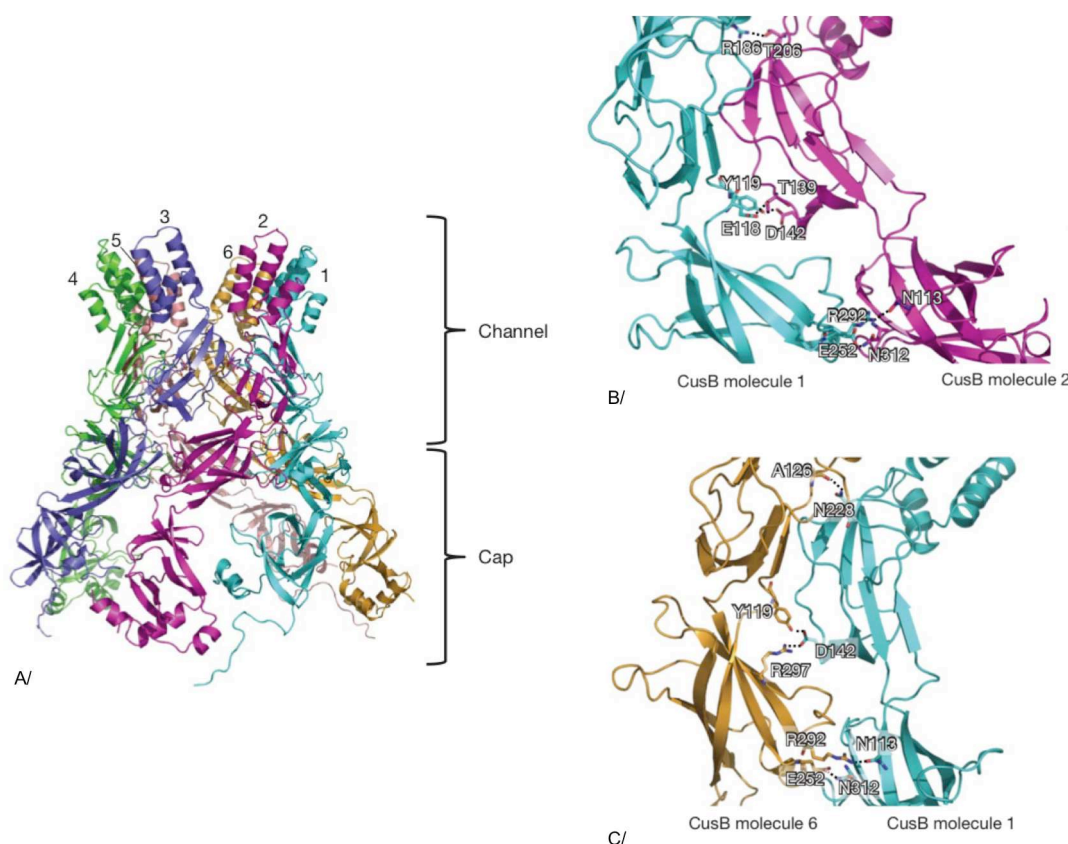


Fig. 44: Structure de l'hexamère de CusB (Su, Long *et al.* 2011)

(A/) Les six molécules de CusB sont représentées en $C\alpha$ et colorées en cyan, rose, violet, vert, saumon et orange. Les domaines 1 et la partie inférieure des domaines 2 forment le domaine Cap de l'hexamère alors que la partie supérieure des domaines 2 associée aux domaines 3 et 4 créent le domaine "channel" de l'hexamère. (B/) Représentation des résidus impliqués dans l'interaction entre les monomères 1 et 2 voisins de CusB. (C/) Représentation des résidus impliqués dans l'interaction entre les monomères 1 et 6 voisins de CusB.

7.4.4. Les interactions OMF-RND

Alors que les interactions OMF-MFP et MFP-RND ont facilement été mises en évidence et largement caractérisées, l'interaction entre la protéine OMF et le transporteur RND est beaucoup moins documentée. Tikhonova et Zgurskaya (2004) ont détecté un complexe AcrAB-TolC seulement en présence d'AcrA et par pontage chimique (Tikhonova and Zgurskaya 2004). Par la suite, Touze, Eswaran *et al.* (2004) ont mis en évidence un complexe AcrB-TolC en absence d'AcrA par pontage *in vivo* avec du dithiobis succinimidyl propionate (DSP). Toutefois, malgré la proximité des protéines ainsi déterminée, aucun changement d'enthalpie ($\Delta H=0$) n'a pu être observé entre TolC et AcrB par ITC, suggérant que l'interaction entre ces deux protéines n'est pas stable en l'absence d'AcrA. Cette proximité a été confirmée par un pontage spontané des deux protéines après mutagenèse en cystéine de résidus situés dans la zone de contact supposée (Q255, D256, G257 d'AcrB et G147, Q142, R143, A150 de TolC) (Tamura, Murakami *et al.* 2005).

7.4.5. Les modèles du complexe tripartite

Comme on a pu le voir dans les paragraphes précédents, c'est en disséquant chaque interaction entre deux partenaires que l'on arrive finalement à modéliser l'assemblage de la pompe sous sa forme fonctionnelle tripartite, faute de structure de la pompe entière à l'échelle atomique. En 2004, Fernandez-Recio proposait un modèle d'assemblage (3 :3 :3) dans lequel AcrA était en contact avec AcrB et s'insérait entre les hélices α de la forme ouverte de TolC (Fig. 45A) (Fernandez-Recio, Walas *et al.* 2004). Cette stoechiométrie a été reprise par Symmons *et al.*, (2009) afin de générer un nouveau modèle se basant cette fois sur des données de pontage entre AcrA et AcrB (Fig. 45B) (Symmons, Bokma *et al.* 2009). Cependant, à l'heure actuelle, la synthèse des données bibliographiques semble s'orienter plutôt vers une stoechiométrie (3 :6 :3). C'est ce que présente notamment Xu *et al.*, (2011) (Fig. 45E) aux vues de l'état hexamérique de la MFP démontré par le système chimérique MacA. L'oligomère d'AcrA s'insère parfaitement autour du domaine de sortie des substrats d'AcrB grâce à la forme triangulaire adoptée par les domaines lipoyl et tonneaux β . Chaque paire de domaines « membrane proximal » d'AcrA vient

alors interagir avec le domaine pore du transporteur sans bloquer le site d'entrée des substrats (Fig. 45D). Les domaines α -hairpin entrent eux en contact avec les sillons intra-protomères des hélices α de TolC qui vont elles mêmes pouvoir interagir avec AcrB par leur extrémités. Cette hypothèse de complexe (3 :6 :3) est aussi appuyée par la récente structure du complexe CusAB (3 :6) complétée par le docking de CusC (Long, Su *et al.* 2012) (Fig. 45C et D). Bien que l'on ait pu douter de la ressemblance de ce transporteur d'ions avec les transporteurs de drogues, une telle stoechiométrie est également confirmée pour le système d'efflux MtrCDE de *Neisseria gonorrhoeae* (Janganan, Bavro *et al.* 2011).

L'ordre de la séquence d'interaction entre les trois partenaires reste pour l'heure inconnu. Une première hypothèse prévoit la pré-formation du complexe stable MFP-OMF avec la protéine OMF dans une conformation fermée. La liaison de la RND induirait un réarrangement de la MFP permettant de dilater l'extrémité de l'OMF qui passerait à une conformation ouverte favorable à l'efflux. C'est l'hypothèse soutenue par les travaux de Mokhonov *et al.* (Mokhonov, Mokhonova *et al.* 2004). Le modèle alternatif proposé suggère un premier mouvement des hélices externes de la protéine OMF lui permettant de se positionner à l'apex de la protéine RND, dégageant ainsi les sillons intra-monomériques pour l'accommodation de la MFP. Un deuxième mouvement suivrait afin de terminer l'ouverture de la porine pour établir un efflux. La MFP transmettrait ainsi l'énergie du transporteur RND à la porine favorisant la transition allostérique de la protéine OMF d'un état fermé à un état ouvert. Cette hypothèse s'appuie sur les observations de (Bavro, Pietras *et al.* 2008) et (Fernandez-Recio, Walas *et al.* 2004).

On voit donc que dans tous les cas, la protéine MFP joue un rôle crucial dans la stabilisation des interactions OMF-RND et donc dans l'assemblage du complexe tripartite (Misra and Bavro 2009).

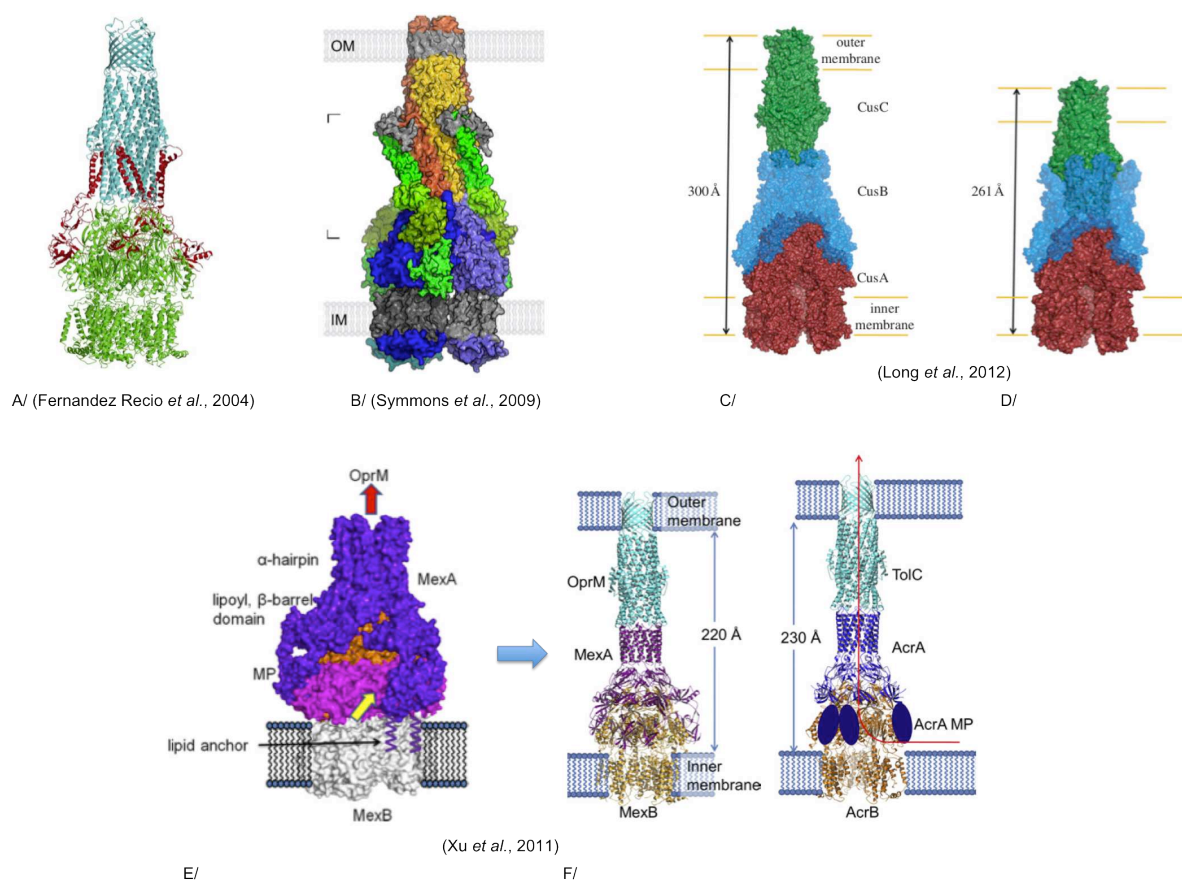


Fig. 45: Différents modèles d'assemblage du complexe tripartite RND-MFP-OMF

(A/) Structure en $C\alpha$ du modèle TolC-AcrA-AcrB (3 : 3 : 3) proposé par Fernandez-Recio et al. (2004). AcrA (rouge) s'insère simultanément dans les sillons interprotomères d'AcrB (vert) et TolC (cyan). (B/) Surface du modèle TolC-AcrA-AcrB (3 : 3 : 3) proposé par Symmons et al. (2009). Le trimère de TolC est coloré en orange et jaune, AcrA est colorée en vert et le trimère d'AcrB en bleu. Les parties membranaires d'AcrB et TolC ainsi que le domaine équatorial de TolC sont colorés en gris. (C/ et D/) Surface du modèle CusC-CusB-CusA (3 : 6 : 3) après docking de CusC sur la structure de CusAB. Le recrutement de CusC (en vert) est schématisé en (C/) avec un contact entre l'extrémité des hélices α de CusC et le domaine 4 en hélices α de CusB (bleu). Après insertion dans la couronne hexamérique de CusB, CusC entre en contact avec l'extrémité supérieure de CusA (rouge). Cette région est entourée des domaines 2 de CusB. (E/) Docking de l'hexamère de MexA sur MexB. Les surfaces des deux protéines sont colorées en violet pour MexA et respectivement en rose et orange pour les domaines « pore » et « chapeau » de MexB. (F/) Modèle de l'assemblage tripartite (3 : 6 : 3) proposé par Xu et al., (2011) pour les systèmes d'efflux d'antibiotiques d'*E. coli* et *P. aeruginosa*. La structure de chaque protéine est représentée en $C\alpha$ et colorée en cyan pour les OMF, bleu ou rose pour les MFP et orange pour les transporteurs RND. Les domaines MP d'AcrA absents sur la structure cristallographique sont matérialisés par des disques bleus. Le chemin d'efflux des antibiotiques est indiqué par une flèche rouge. La différence de 10 Å observée entre les deux systèmes s'explique par le domaine α -hairpin de MexA plus court que celui d'AcrA.

8. Présentation de la thèse

Comme nous avons pu le voir, la connaissance des processus de résistance développés par *Pseudomonas aeruginosa* se sont améliorées ces dernières années. Elle s'est notamment enrichie de nombreuses structures cristallographiques et d'études fonctionnelles permettant de mieux comprendre les procédés au niveau moléculaire. Néanmoins, de nombreuses questions restent en suspens, notamment en ce qui concerne l'assemblage et l'ouverture des pompes à efflux, le contrôle de ces événements, ainsi que la régulation de l'expression des différentes protéines membranaires impliquées. Ma thèse avait pour but de répondre à certaines de ces questions. Mon sujet de thèse porte principalement sur l'étude fonctionnelle de la pompe d'efflux MexAB-OprM, que j'ai abordée au moyen de nouveaux outils empruntés à la physique, à la biochimie et à la microbiologie. Les résultats, dont certains ont déjà fait l'objet de publications, seront présentés suivant quatre parties :

- (1) L'étude de l'assemblage entre OprM et MexA par BN-PAGE (*Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) (Ferrandez, Monlezun *et al.* 2012) : nous avons réadapté le protocole développé par Wittig, Braun *et al.* (2006) notamment par l'ajout de détergent pour pouvoir étudier nos protéines membranaires. Nous avons ainsi pu montrer que MexA interagit avec un trimère d'OprM sous forme d'oligomères qui sont uniquement des multiples de 2 (2, 4, 6 ou plus) et d'autre part que la palmitoylation de la MFP semble nécessaire à la stabilisation d'un tel complexe.

- (2) L'étude par électrophysiologie de l'ouverture de la porine OprM (Wang, Monlezun *et al.* 2012) : en collaboration avec l'équipe de B. Le Pioufle, nous avons pu caractériser l'activité « porine » d'OprM insérée dans une bicouche lipidique reconstituée au sein d'un système microfluidique. L'insertion stable d'OprM dans cette membrane artificielle a permis de mesurer une conductance du canal de 1250 pS dans les conditions utilisées, avec des fluctuations à des niveaux intermédiaires caractérisant vraisemblablement le mouvement des hélices périplasmiques nécessaire à l'ouverture.
- (3) La caractérisation de mutants d'ouverture de l'extrémité périplasmique d'OprM par des expériences de complémentation : nous avons créé différents mutants afin de rompre les liaisons responsables de la conformation fermée de la porine et étudié leur capacité à effluer les antibiotiques dans une souche de *Pseudomonas aeruginosa* délétée d'OprM.
- (4) La modélisation du régulateur MexZ de la pompe MexAB-OprM ainsi que la modélisation d'OprD, la porine d'influx des carbapénèmes, afin de discuter de l'importance de certains acides aminés et d'éventuelles relations structure/fonction à partir de mutants cliniques observés par nos collaborateurs P. Plésiat et C. Llanes, qui nous avaient reçu dans leur laboratoire afin de nous former à la technique d'analyse par complémentation *in vivo*.

PARTIE II : MATERIELS & METHODES

1. Biologie Moléculaire

1.1. Clonage des gènes *oprM* et *mexA* dans un vecteur d'expression

1.1.1. Amplification des inserts

Les séquences des gènes *oprM* et *mexA* ont été amplifiées indépendamment par PCR à partir du plasmide pOM1 contenant l'opéron *mexAB-oprM* (Kohler, Kok *et al.* 1996) grâce aux amorces OprM-5'-NdeI et OprM-3'-HisXmaI pour *oprM* et MexA-5'-NdeI et MexA-3'-HisXmaI pour *mexA*. Une version non palmitylée cytoplasmique de la protéine MexA commençant au résidu Gly25 a également été clonée, dénommée MexAnp pour "MexA non palmitylée" (par analogie la protéine sauvage est dénommée MexAp). Pour cela une amplification par PCR a été réalisée comme précédemment avec la paire d'amorces MexA-NP-5'-NdeI et MexA-NP-3'-HisXbaI (Fig. 46).

Les réactions PCR sont réalisées sur un appareil thermocycleur Mastercycler® pro (Eppendorf), dans les conditions expérimentales décrites en Fig. 47 et avec une ADN Polymérase Phusion produite au laboratoire.

Ces amplifications PCR permettent d'insérer de part et d'autre du gène, les sites de coupures reconnus par les enzymes de restrictions utilisées pour le clonage (NdeI, XmaI ou XbaI) ainsi qu'une étiquette de 6 histidines (6His) au niveau de l'extrémité C-terminale du gène qui sera utilisée ultérieurement pour la purification des protéines sur une résine de nickel.

Protéine	Nom amorce	Séquence amorce (5'-->3')	Tm (°C)
OprM	OprM-5'-NdeI	<u>ggaattccat</u> atgaaacggtccttccttcc	62
	OprM-3'-HisXmaI	<u>tcccccgggtcagtgatggtgatggtgatg</u> agcctggggatcttccttcttcgcggtctg	78
MexAp	MexA-5'-NdeI	<u>ggaattccat</u> atgcaacgaacgccagccatgcgtgtactg	70
	MexA-3'-HisXmaI	<u>tcccccgggtcagtgatggtgatggtgatg</u> gcccttgctgtcggttttc	76
MexAnp	MexA-NP-5'-NdeI	<u>ggaattccat</u> atgggaaaagcgaggcgccg	69
	MexA-NP-3'-HisXbaI	<u>tgctctagatcagtgatggtgatggtgatg</u> gcccttgctgtcggttttcgc	73

Fig. 46: Amorces utilisées pour le clonage d'OprM et MexA dans le vecteur d'expression pBAD33-GFPuv

La séquence de l'amorce s'hybridant sur le gène considéré est notée en gras, l'étiquette 6His est représentée en italique et les sites de coupure des enzymes de restriction sont soulignés sur chaque amorce.

Composant	Concentration Initiale	Volume/Réaction
Matrice ADN	~ 100 ng/μL	1 μL
Amorce 5'	20μM	1 μL
Amorce 3'	20μM	1 μL
dNTPs	10mM	1 μL
Tampon Phusion	10X	5 μL
DNA pol. Phusion	100X	1 μL
H ₂ O		40 μL
Volume Final		50 μL

Etape	Température	Tps	Nb. de cycles
Dénaturation initiale	98°C	30s	1
Dénaturation	98°C	10s	30
Hybridation	58°C	30s	
Elongation (~1min/kb)	72°C	2min	
Elongation finale	72°C	5min	1

Fig. 47: Exemple de protocole de PCR utilisé pour les clonages

A gauche sont indiquées les quantités de réactif à utiliser pour une réaction PCR de 50μL. Un descriptif type du programme PCR utilisé pour la polymérase Phusion est donné à droite.

1.1.2. Le vecteur d'expression pBAD33-GFPuv

Le vecteur d'expression que nous utilisons, le pBAD33-GFPuv (6113pb) (Benhabdelhak *et al.*, non publié), est un dérivé du pBAD33 décrit par Guzman *et al.* (Guzman, Belin *et al.* 1995) dans lequel a été inséré un fragment de 1726pb issu du vecteur pBAD-GFPuv (Crameri, Whitehorn *et al.* 1996) après digestion PaeI-EcoRV. Il porte le gène CAT de résistance au chloramphénicol (gène codant pour la chloramphénicol acétyl-transférase) utilisé comme marqueur de sélection, et le promoteur pBAD inductible au L-arabinose (Fig. 48). Lors du clonage de nos gènes d'intérêt le gène de la GFP est supprimé ce qui permet un criblage visuel

directement sur boîte de pétri des clones positifs. En effet, en présence de L-arabinose et sous UV, les clones positifs ne seront plus fluorescents.

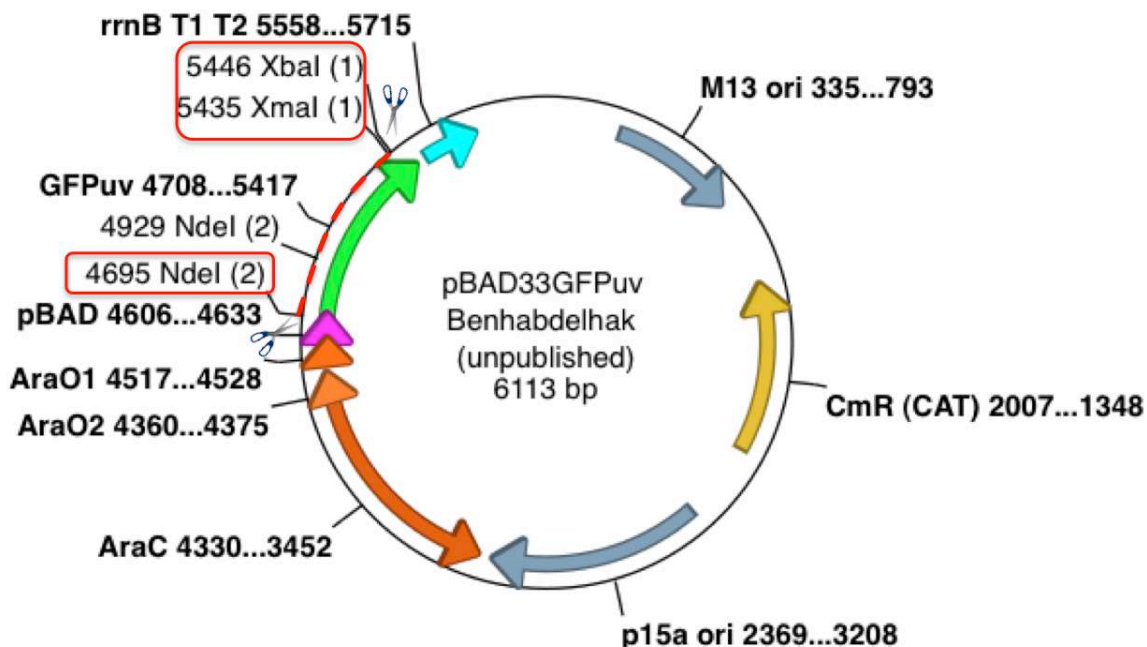


Fig. 47: Carte du plasmide pBAD33-GFPuv (Benhabdelhak *et al*, non publié)

Les origines de réplication M13 et p15a sont indiquées par des flèches grises et le gène conférant la résistance au chloramphénicol en jaune. Le promoteur pBAD est indiqué par une flèche rose et les éléments de sa régulation (opérateurs arabinose et AraC) par des flèches orange. Le gène codant pour la GFP, en aval du promoteur, est matérialisé par une flèche verte. Il est supprimé lorsque, pour les clonages, on effectue une digestion par les enzymes de restriction NdeI et XmaI ou XbaI (encadrés en rouge).














1.1.3. Digestion, Ligation et Transformation

Les produits d'amplification d'une taille de 1496pb, 1190pb et 1120pb pour OprM, MexAp et MexAnp respectivement, sont digérés pendant une nuit par les enzymes de restriction NdeI et XmaI pour *oprM* et *mexA* ou NdeI et XbaI pour *mexAnp* (New England Biolabs).

Après purification avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur (cf. Fig. 49), les inserts digérés sont ligués au pBAD33-GFPuv préalablement digéré par ces mêmes enzymes. La ligation est effectuée par la T4 DNA ligase (New England Biolabs) pendant 5h à 16°C.

5 µL de produit de ligation sont utilisés pour transformer par électroporation une souche XL1 d'*E. coli* électrocompétente par 1 pulse à 2,5 kV sur un électroporateur Micropulseur (Biorad). Après 45 minutes d'incubation à 37°C, la transformation est étalée sur une boîte LB contenant du chloramphénicol à 25 µg/mL (boîte LBC) et incubée une nuit dans une étuve à 37°C.

PCR clean-up, gel extraction**Protocol-at-a-glance (Rev. 02)**

	PCR clean-up	Gel extraction	DNA clean-up (with SDS)	Single stranded DNA clean-up
1 <u>PCR clean-up, DNA clean-up, or single stranded DNA clean-up:</u> Adjust binding condition <u>Gel extraction:</u> Excise DNA fragment / solubilize gel slice	 200 µL NT1/ 100 µL PCR	  200 µL NT1/ 100 mg gel 50 °C 5–10 min	 500 µL NTB/ 100 µL sample	 200 µL NTC/ 100 µL sample
2 Bind DNA	  11,000 x g 30 s			
3 Wash silica membrane	  700 µL NT3 11,000 x g 30 s <u>Recommended:</u> 2 nd wash 700 µL NT3 11,000 x g 30 s			
4 Dry silica membrane	  11,000 x g 1 min			
5 Elute DNA	  15–30 µL NE RT 1 min 11,000 x g 1 min			

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6–8 · 52355 Düren · Germany
 Tel.: +49 24 21 969-270 · Fax: +49 24 21 969-199 · tech-bio@mn-net.com · www.mn-net.com























Fig. 49 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up
 (Macherey-Nagel)

1.1.4. Criblage des clones recombinants

Une préculture de 5 mL en milieu LB additionné de chloramphénicol à 25 µg/mL est réalisée à partir des colonies apparues sur la boîte LBC afin de purifier les plasmides recombinants à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur (cf. Fig. 50).

Plasmid DNA Purification**Protocol-at-a-glance (Rev.07)**

	NucleoSpin® Plasmid	NucleoSpin® Plasmid (NoLid)	NucleoSpin® Plasmid QuickPure
1 Cultivate and harvest bacterial cells			
		11,000 x g 30 s	11,000 x g 30 s
2 Cell lysis			
		250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, 5 min 300 µL Buffer A3	250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, 5 min 300 µL Buffer A3
3 Clarification of the lysate			
		11,000 x g 5 – 10 min	11,000 x g 5 min
4 Bind DNA			
		Load supernatant 11,000 x g 1 min	Load supernatant 11,000 x g 1 min
5 Wash silica membrane			
		(Optional: 500 µL Buffer AW) 500 µL Buffer A4 11,000 x g 1 min	450 µL Buffer AQ 11,000 x g 3 min
6 Dry silica membrane			
		11,000 x g 2 min	Drying is performed during centrifugation of the single washing step
7 Elute DNA			
		50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g 1 min	50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g 1 min

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG • Neumann-Neander-Str. 6-8 • D-52355 Düren • Germany
Tel.: +49 (0) 24 21 969 270 • www.mn-net.com • e-mail: tech-bio@mn-net.com



Fig. 50 : Protocole d'utilisation du kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure
(Macherey-Nagel)

Une PCR de criblage est réalisée à partir des amorces ayant servi au clonage. Les plasmides des clones positifs sont ensuite séquencés avant d'être utilisés pour la production.

Ces plasmides contenant soit le gène *oprM* soit le gène *mexA*, soit sa version tronquée, seront nommés pPMM, pPMA et pPMA_{np} respectivement.

1.2. Mutagenèse dirigée sur le gène *oprM*

Pour étudier le mécanisme d'ouverture périplasmique d'OprM (cf. Résultats, paragraphe 3) nous avons décidé de muter certains résidus supposés être impliqués dans le maintien d'un état fermé d'OprM. Nous voulions ensuite cloner ces versions mutées du gène *oprM* (1) dans un vecteur compatible avec une expression stable au sein des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, le pME6001, pour réaliser les expériences de complémentation, (2) dans le vecteur pBAD33-GFP_{uv} afin de pouvoir surproduire les protéines mutantes correspondantes pour des études biochimiques. Nous avons donc choisi au préalable de re-cloner le gène *oprM* sauvage dans un vecteur de clonage de plus petite taille, le pUC19 (2686pb) pour faciliter la mutagenèse puis de sous-cloner les inserts mutés dans les deux vecteurs cités précédemment.

1.2.1. Clonage d'OprM dans le pUC19

Le gène *oprM* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pPMM (cf. paragraphe 1.1.4) toujours grâce aux amorces OprM-5'-NdeI et OprM-3'-HisXmaI et selon les conditions décrites dans le paragraphe 1.1.1.

L'insert ainsi amplifié a été digéré pendant une nuit avec les enzymes NdeI et XmaI puis inséré dans le vecteur pUC19 préalablement digéré par les mêmes enzymes. La ligation, la transformation et le criblage des clones suivent le même protocole expérimental que celui décrit dans les paragraphes 1.1.3 et 1.1.4 à la différence près que le pUC19 porte une résistance à l'ampicilline nécessitant un étalement et des précultures en milieu LB + ampicilline 100 µg/mL.

Nous disposons ainsi d'une nouvelle construction portant le nom de pUC19-OprM_{wt}.

1.2.2. Mutagenèse dirigée sur le pUC-OprMwt

Nous avons réalisé 4 mutants d'OprM portant des mutations simples sur les acides aminés (numérotés à partir de la forme mature de la protéine) D416, R419, tous deux mutés en alanine et R403, Y404, respectivement mutés en leucine et phénylalanine. Nous avons également construit deux mutants contenant les combinaisons de deux mutations : D416A-R419A et R403L-Y404F. Pour cela les amorces résumées dans la figure 51 ont été utilisées.

Mutation	Nom amorce	Séquence amorce (5'-->3')	T _m (°C)
D416A	OprM-D416-Fwd	CTGACCCTGCTC Gc CGCGCAACGCTCGCTGTTC	73
	OprM-D416-Rev	GAACAGCGAGCGTTGCGC Gg CGAGCAGGGTCAG	
R419A	OprM-R419-Fwd	CTGACCCTGCTCGACGCGCA gct TCGCTGTTC	71
	OprM-R419-Rev	GAACAGCGA agc TTGCGCGTCGAGCAGGGTCAG	
R403L	OprM-R403-Fwd	ACAAG Ct CTATCGCACGGGGGTGGACAACCTAC	67
	OprM-R403-Rev	GTAGTTGTCCACCCCCGTGCGATA Ga GCTTGT	
Y404F	OprM-Y404-Fwd	GCGC Tt TCGCACGGGGGTGGACAACCTACCT	69
	OprM-Y404-Rev	AGGTAGTTGTCCACCCCCGTGCG Aa AGCGC	
D416A-R419A	OprM-416419-Fwd	CTGCTC Gc CGCGCA gct TCGCTGTTC	67
	OprM-416419-Rev	GAACAGCGA agc TTGCGC Gg CGAGCAG	
R403L-Y404F	OprM-403404-Fwd	ACAAG Ct Ct TCGCACGGGGGTGGACAACCTAC	67
	OprM-403404-Rev	GTAGTTGTCCACCCCCGTGCG Aa Aga GCTTGT	

Fig. 51: Amorces utilisées pour la mutagenèse sur *oprM*

Les bases correspondant au codon à muter sont indiquées en gras avec en italique la ou les bases modifiées par rapport à la séquence présente sur le gène oprM sauvage.

Les simples mutants ont été construits de la manière suivante :

- une amplification complète du plasmide est réalisée par PCR grâce aux amorces Fwd et Rev correspondant à chaque mutation avec un temps d'élongation de 4 minutes selon les conditions décrites dans la figure 46.
- Après purification du produit PCR avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), l'ADN plasmidique matrice (pUC-OprMwt) est spécifiquement dégradé par une digestion DpnI (New England Biolabs) réalisée à 37°C pendant 5 heures (Fig. 52A).

- Le produit de digestion est ensuite transformé dans une souche XL1 d'*E. coli* électrocompétente selon les recommandations du paragraphe 1.1.3 puis la transformation est étalée sur boîte LB + ampicilline 100 µg/mL (boîte LBA).

Pour la construction des doubles mutants, seule l'étape de PCR a été réalisée mais de manière différente (Fig. 52B). Dans ce cas, deux hémi-PCR ont été réalisées :

- une hémi-PCR avec l'amorce OprM-5'-NdeI (pour clonage dans le pBAD33GFPuv) ou OprM-pseudo-5'-EcoRI (pour le clonage dans le vecteur pME6001) et l'amorce « Rev » contenant la mutation désirée générant un fragment de ~1275pb après 2 minutes d'élongation.
- une hémi-PCR avec l'amorce OprM-3'-HisXmaI (pour clonage dans le pBAD33GFPuv) ou OprM-pseudo-3'-SacI (pour le clonage dans le vecteur pME6001) et l'amorce « Fwd » contenant la mutation désirée générant un fragment de ~225pb après 30 secondes d'élongation.

1 µL de chaque hémi-PCR ont ensuite servi de matrice pour une PCR de fusion réalisée selon les conditions de la figure 46 avec le couple d'amorce OprM-5'-NdeI et OprM-3'-HisXmaI pour le clonage dans le pBAD33GFPuv ou avec le couple d'amorce OprM-pseudo-5'-EcoRI et OprM-pseudo-3'-SacI (cf. Fig. 54) pour le clonage dans le vecteur pME6001). Le produit PCR final ainsi obtenu a été ensuite purifié avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) en vue de sa digestion.

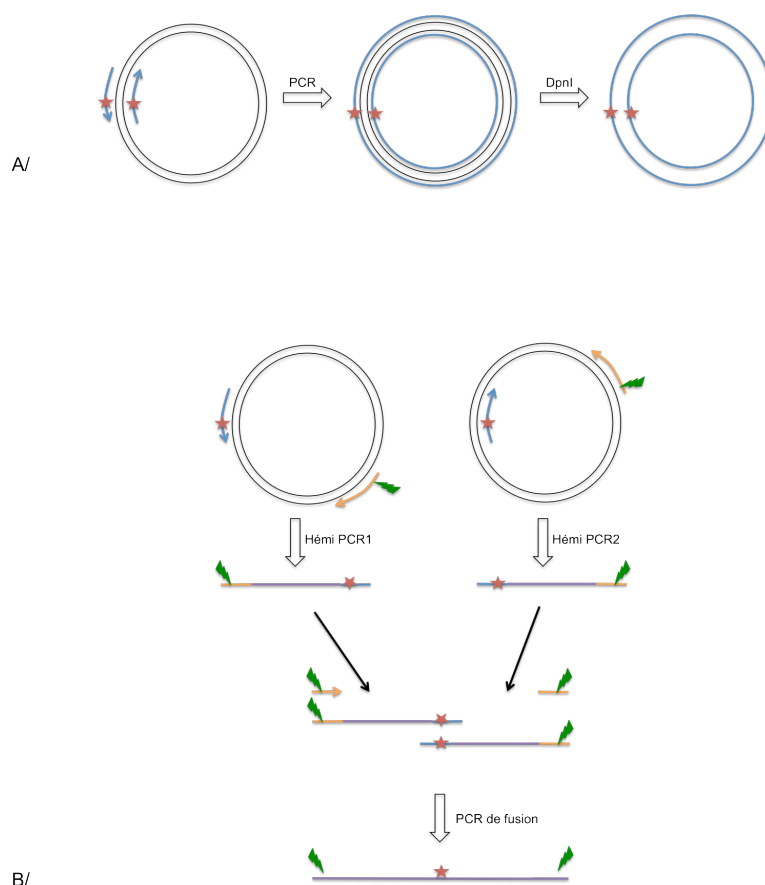


Fig. 52: Principe des PCR de mutagenèse

(A/) *Mutagenèse circulaire.* Les amorces mutées strictement complémentaires (flèches bleues avec la mutation indiquée par une étoile rouge) sont utilisées pour amplifier chaque brin de plasmide. Le plasmide matrice (double cercle noir) est ensuite spécifiquement éliminé par digestion avec l'enzyme DpnI et seul reste le plasmide muté ainsi généré (double cercle bleu) (B/) *Mutagenèse par héli-PCRs et PCR de fusion.* Deux héli-PCRs sont chacune réalisées à partir d'une amorce mutée et d'une amorce normale s'hybridant à une extrémité du gène d'intérêt (flèche orange avec le site de restriction enzymatique matérialisé par un éclair vert). Les produits des deux réactions servent ensuite de matrice pour une PCR de fusion réalisée à partir des deux amorces normales situées de part et d'autre du gène d'intérêt. Le produit de fusion générée (trait violet avec les deux sites de restriction enzymatique) devra être digéré par les enzymes adéquates pour son insertion dans le plasmide désiré.

1.2.3. Clonage des mutants d'OprM dans le vecteur pME6001

1.2.3.1. Le vecteur pME6001

Le vecteur pME6001 nous a été donné par l'équipe du Pr. Patrick Plésiat à Besançon avec qui nous collaborons. Ce vecteur est un vecteur compatible

avec une utilisation aussi bien dans des souches d'*E. coli* que dans des souches de *Pseudomonas aeruginosa* pour des études fonctionnelles. Il présente une résistance à la gentamicine et dans le cadre de notre clonage EcoRI-SacI (5'→3') l'insert sera sous le contrôle des promoteurs lac + T3 (Fig. 53).

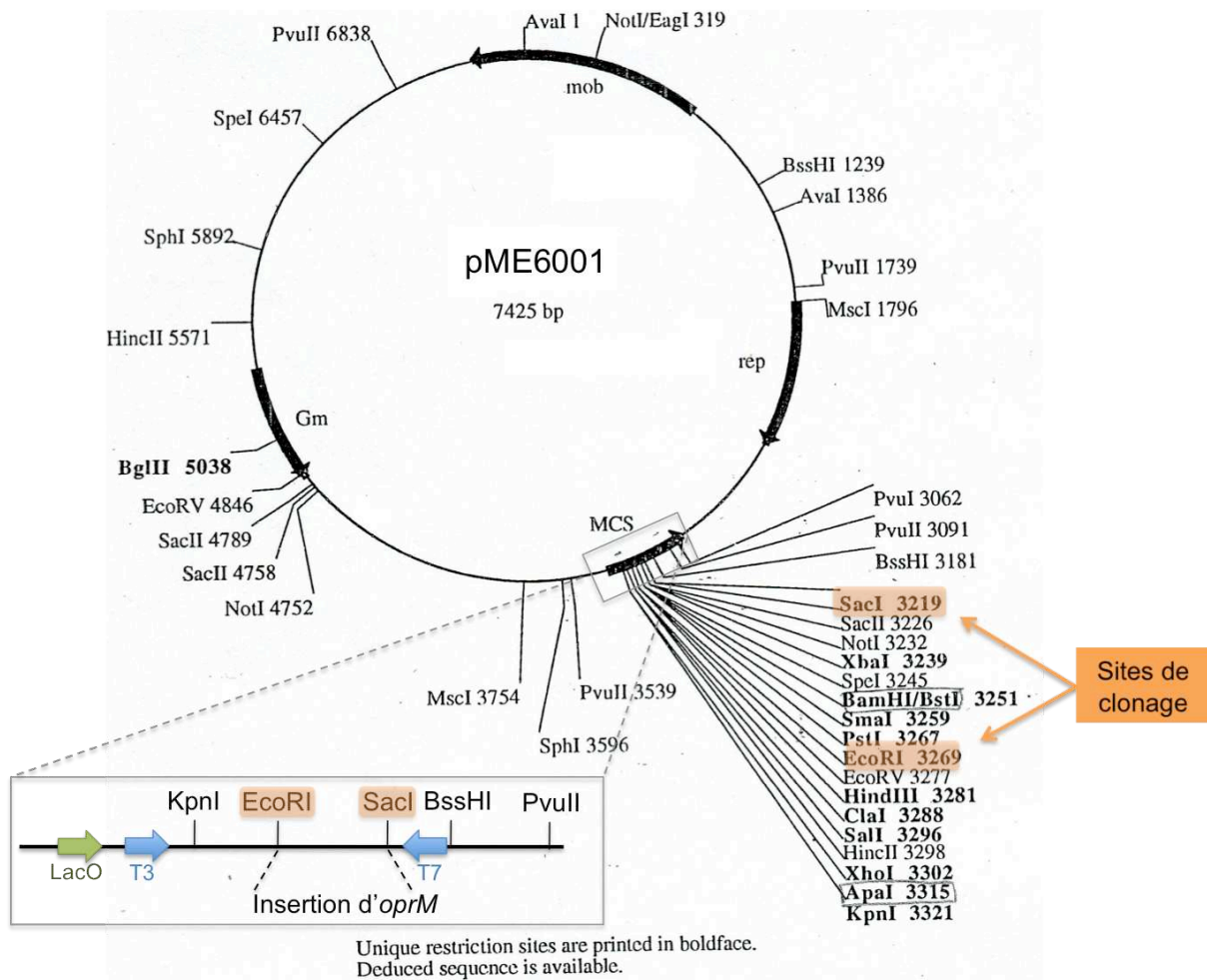


Fig. 53: Carte du plasmide pME6001 utilisé pour les expériences de complémentation chez *Pseudomonas aeruginosa*

Le vecteur pME6001 porte un gène de résistance à la gentamicine (noté Gm) et contient trois promoteurs matérialisés par des flèches bleues et vertes : deux sont situés en amont du site multiple de clonage (Lac et T3) et un en aval (T7). Les sites utilisés pour le clonage (EcoRI et SacI) sont surlignés en orange. D'autres sites d'enzymes de restriction sont annotés sur la carte avec leur position relative par rapport au site Aval en haut de la carte.

1.2.3.2. Clonage

Pour cloner les simples mutants, une PCR est réalisée à partir des plasmides pUC19-OprMmutants avec les amorces OprM-pseudo-5'-EcoRI et OprM-pseudo-3'-SacI (cf. Fig. 54) en appliquant le protocole décrit en Fig. 47. Les produits PCR sont ensuite purifiés avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) avant digestion enzymatique.

Nom amorce	Séquence amorce (5'-->3')	Tm (°C)
OprM-pseudo-5'-EcoRI	gaagtcggaattc atgaaacggtccttcctttcc	66
OprM-pseudo-3'-SacI	agcgaccgagctcggtc agtgatggatggtg	69

Fig. 54: Amorces utilisées pour le clonage des mutants OprM dans le pME6001

La séquence de l'amorce s'hybridant sur la matrice ADN est notée en gras, la partie de l'étiquette 6His est représentée en italique sur l'amorce 3' et les sites de coupures des enzymes de restriction sont soulignés sur chaque amorce.

Les PCR de fusion EcoRI-SacI contenant les doubles mutations D416A-R419A et R403L-Y40F décrits dans le paragraphe 1.2.2 et ceux décrits ci dessus sont digérés sur la nuit avec les enzymes de restriction EcoRI et SacI (New England Biolabs) puis ligués dans un rapport insert/vecteur 1 : 3 (v/v), au vecteur pME6001 préalablement digéré par ces mêmes enzymes. La transformation est effectuée comme décrit précédemment (cf. paragraphe 1.1.3) puis étalée sur une boîte de LB contenant de la gentamicine à une concentration finale de 15 µg/mL. Comme pour les autres clonages, le criblage des clones est effectué par PCR avec les amorces ayant servi au clonage.

Nous disposons ainsi après séquençage de 6 nouveaux plasmides dénommés : pME6001-OprM-D416A, pME6001-OprM-R419A, pME6001-OprM-R403L, pME6001-OprM-Y404F, pME6001-OprM-D416A-R419A et pME6001-OprM-R403L-Y404F.

De plus, tout récemment nous avons fait cloner par la plateforme IMAGIF à Gif-sur-Yvette, un dernier mutant comportant les quatre mutations R403L-Y404F-D416A-R419A, à partir du plasmide pME6001-OprM-R403L-Y404F et des

amorces OprM-416-419-Fwd et OprM-416-419-Rev. Par soucis de simplicité, nous appellerons ce mutant pME6001-OprM-Quad. Mut.

1.2.4. Clonage des mutants d'OprM dans le vecteur pBAD33GFPuv

Nous avons choisi de produire certains mutants pour des caractérisations biochimiques. Il s'agit des mutants D416A, D416A-R419A, Y404F et R403L-Y404F.

Un plasmide d'expression contenant la mutation D416A nous a été donné par le Dr Henrietta Venter (Royal Society Dorothy Hodgkin Fellow, Department of Pharmacology, Cambridge University). Il s'agit d'un vecteur pET41 portant une résistance à la kanamycine dans lequel a été inséré, entre les sites NdeI et HindIII, le gène muté d'OprM avec une étiquette 8His à l'extrémité C-terminale. Nous utilisons donc directement ce plasmide (nommé pOprMH-D433A) pour produire la protéine OprM-D416A.

Pour les trois autres mutants, une PCR a été réalisée afin de cloner les inserts entre les sites NdeI et XmaI du pBAD33-GFPuv comme pour la forme sauvage de la protéine. Pour cela, les amorces OprM-5'-NdeI et OprM-3'-HisXmaI ont été utilisées sur les matrices pUC-OprMmutants. Pour les doubles mutants, les PCR de fusion décrites dans le paragraphe 1.2.2 ont été utilisées.

Les étapes de digestion, ligation, transformation et criblage ont été effectuées de manière similaire à la description faite dans le paragraphe 1.1.3 et 1.1.4.

	Description		Références
pBAD33-GFPuv	Vecteur d'expression dérivé du pBAD33 par insertion du gène de la GFP aux sites PaeI EcoRV, promoteur Lac, 6113pb	Cm ^R	Benhabdelhak, unpublished
pPMM	pBAD33-GFPuv contenant le gène <i>oprM</i> inséré aux sites NdeI XmaI avec un tag 6His en C terminal	Cm ^R	Benhabdelhak, unpublished
pPMA	pBAD33-GFPuv contenant le gène <i>mexA</i> inséré aux sites NdeI XmaI avec un tag 6His en C terminal	Cm ^R	Benhabdelhak, unpublished
pPMA _{np}	pBAD33-GFPuv contenant le gène codant pour la protéine MexA délétée des 24 premiers acides aminés inséré aux sites NdeI XbaI avec un tag 6His en C terminal	Cm ^R	Benhabdelhak, unpublished
pUC19	vecteur de clonage multicopies, 2686pb	Amp ^R	(Yanisch-Perron et al., 1985)
pUC19-OprMwt	pUC19 contenant le gène <i>oprM</i> inséré aux sites NdeI XmaI avec un tag 6His en C terminal	Amp ^R	cette étude
pUC19-OprM-R403L	Dérivé du pUC19-OprM portant la mutation R403L	Amp ^R	cette étude
pUC19-OprM-Y404F	Dérivé du pUC19-OprM portant la mutation Y404F	Amp ^R	cette étude
pUC19-OprM-D416A	Dérivé du pUC19-OprM portant la mutation D416A	Amp ^R	cette étude
pUC19-OprM-R419A	Dérivé du pUC19-OprM portant la mutation R419A	Amp ^R	cette étude
pME6001	Vecteur de clonage dérivé du pME6000, compatible avec les souches d'E. coli et de Pseudomonas aeruginosa, 7425pb	Gm ^R	(Blumer et al. 1999)
pME6001-OprM-R403L	Dérivé du pME6001 codant pour la protéine OprM avec la mutation R403L	Gm ^R	cette étude
pME6001-OprM-Y404F	Dérivé du pME6001 codant pour la protéine OprM avec la mutation Y404F	Gm ^R	cette étude
pME6001-OprM-D416A	Dérivé du pME6001 codant pour la protéine OprM avec la mutation D416A	Gm ^R	cette étude
pME6001-OprM-R419A	Dérivé du pME6001 codant pour la protéine OprM avec la mutation R419A	Gm ^R	cette étude
pME6001-OprM-R403L-Y404F	Dérivé du pME6001 codant pour la protéine OprM avec les mutations R403L et Y404F	Gm ^R	cette étude
pME6001-OprM-D416A-R419A	Dérivé du pME6001 codant pour la protéine OprM avec les mutations D416A et R419A	Gm ^R	cette étude
pME6001-OprM-Quad. Mut.	Dérivé du pME6001 codant pour la protéine OprM avec les mutations R403L, Y404F, D416A et R419A	Gm ^R	cette étude (Plateforme IMAGIF)
pOprMH-D433A	Vecteur d'expression dérivé du pET41 contenant le gène <i>oprM</i> avec la mutation D416A inséré aux sites NdeI HindIII avec un tag 8His en C terminal	Kan ^R	H. Venter, unpublished
pBAD33-OprM-Y404F	pBAD33-GFPuv contenant le gène <i>oprM</i> avec la mutation Y404F, inséré aux sites NdeI XmaI avec un tag 6His en C terminal	Cm ^R	cette étude
pBAD33-OprM-R403L-Y404F	pBAD33-GFPuv contenant le gène <i>oprM</i> avec les mutations R403L et Y404F, inséré aux sites NdeI XmaI avec un tag 6His en C terminal	Cm ^R	cette étude
pBAD33-OprM-D416A-R419A	pBAD33-GFPuv contenant le gène <i>oprM</i> avec les mutations D416A et R419A, inséré aux sites NdeI XmaI avec un tag 6His en C terminal	Cm ^R	cette étude

Fig. 55: Tableau récapitulatif des plasmides utilisés

2. Microbiologie

2.1. Liste des souches utilisées

	Description	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PA01wt	souche sauvage prototrophe	(Stover et al., 2000)
PA01ΔOprM	souche PA01 mutante inactivée dans le gène codant pour la protéine OprM	S. Guénard
<i>Escherichia coli</i>		
BW25113	<i>E. coli</i> wt :	
(nommée <i>E. coli</i> wt)	F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ-, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	
JW3368-1	Souche mutante d' <i>E. coli</i> n'exprimant plus les porines OmpF et OmpC	(Datsenko et al., 2000; Baba et al., 2006)
(nommée ΔompR)	F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ-, ΔompR739::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	
JW5503-1	Souche mutante d' <i>E. coli</i> n'exprimant plus la protéine TolC	(Baba et al., 2006)
(nommée ΔtolC)	F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ-, ΔtolC732::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	
C43(DE3)	souche d'expression de protéines membranaires : dérivée d' <i>E. coli</i> BL21(DE3)[<i>E. coli</i> F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) par mutation génomique non identifiée	(Miroux et Walker, 1996)
XL1	souche de clonage : <i>E. coli</i> recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqΔM15 Tn10 (TetR)]	(Stratagene)

Fig. 56: Tableau récapitulatif des souches utilisées

2.2. Préparation de cellules électrocompétentes

2.2.1. Souches *E. coli*

400 mL de milieu LB sans antibiotique (ou kanamycine 50 µg/mL selon les souches) sont inoculés au 1/50^{ème} à partir d'une préculture de la souche d'*E. coli* désirée puis incubés à 37°C sous agitation (200rpm) jusqu'à DO_{600nm}=0,7. Les cellules sont ensuite centrifugées à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec 1 volume d'eau stérile (400 mL) puis recentrifugé à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C. Un deuxième lavage dans les mêmes conditions est réalisé. Le culot est alors repris dans 1/50 volume (8 mL) de glycérol 10% (w/v) stérile. Après centrifugation à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C, le culot est repris dans 3 mL de glycérol 10% (w/v) et aliquoté par 100 µL. Les aliquots sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C en vue d'une utilisation prochaine.

2.2.2. Souches *P. aeruginosa*

50 mL de milieu MH sans antibiotique sont inoculés au 1/50^{ème} à partir d'une préculture de la souche de *P. aeruginosa* désirée puis incubés à 37°C sous

agitation (200rpm) jusqu'à $DO_{600nm}=0,7$. Les cellules sont ensuite centrifugées à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec 1/2 volume de sucrose 300 mM stérile (25 mL) puis recentrifugé à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C. Un deuxième lavage dans les mêmes conditions est réalisé. Le culot est alors repris dans 1/100 volume (500 µL) de sucrose 300 mM stérile. Les cellules compétentes de *Pseudomonas aeruginosa* ne se conservent pas il faut donc les transformer immédiatement (par aliquot de 100 µL) et en refaire à chaque nouvelle transformation souhaitée (Protocole adapté d'après (Smith and Iglewski 1989).

2.3. Antibiogrammes

2.3.1. Un critère d'évaluation de la résistance

L'antibiogramme est une méthode microbiologique de diffusion en milieu gelosé d'antibiotiques distribués sous forme de disques imbibés. Cette technique permet ainsi d'évaluer de manière simultanée la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de plusieurs antibiotiques en mesurant le diamètre d'inhibition autour des disques.

Cette technique est très souvent utilisée en milieu clinique car les résultats fournis par cette analyse sur la résistance de souches de *Pseudomonas aeruginosa* retrouvées chez les patients, guideront le choix du traitement. En effet, elles permettent de détecter des résistances de bas niveau, de déceler l'apparition de phénomènes épidémiques mais surtout d'optimiser l'antibiothérapie afin d'endiguer l'infection par le bacille pyocyanique.

Les antibiotiques classiquement testés pour le bacille pyocyanique sont :

- la ticarcilline, la pipéracilline, la ceftazidime, l'imipénème, le méropénème, l'aztréonam pour les beta lactamines.
- la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine pour les aminosides.
- la ciprofloxacine pour les fluoroquinolones.
- et la colistine.

En cas d'ambiguïté de diagnostic, une liste complémentaire est fournie. Elle comprend la ticarcilline additionnée de l'acide clavulanique, la pipéracilline en

association avec le tazobactam, la céfépime, le doripénème, la nétilmidine, la lévofloxacine, les sulfamides, la fosfomycine et la rifampicine.

Afin d'homogénéiser l'interprétation, ces méthodes microbiologiques (antibiogrammes et mesure de CMI) sont standardisées et font l'objet de recommandations à l'échelle nationale et européenne promulguées respectivement par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Ces recommandations concernent les aspects pratiques de réalisation d'un antibiogramme et fixent les concentrations critiques pour chaque antibiotique qui définissent une souche sensible (S) ou résistante (R) (et éventuellement insensible (I)). La figure 55 présente les valeurs à considérer pour les souches *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)		Charge des disques (µg)	Diamètres critiques (mm)	
	S	R		S	R
Ticarcilline	≤ 16	> 16	75	≥ 22	< 22
Ticarcilline+Acide Clavulanique	≤ 16 ou 2	16 ou 2	75 ou 10	≥ 22	< 22
Pipéracilline	≤ 16	> 16	75	≥ 18	< 18
Pipéracilline+Tazobactam	≤ 16 ou 4	16 ou 4	75 ou 10	≥ 19	< 19
Ceftazidime	≤ 8	> 8	30	≥ 19	< 19
Céfépime	≤ 8	> 8	30	≥ 19	< 19
Imipénème	≤ 4	> 8	10	≥ 22	< 17
Méropénème	≤ 2	> 8	10	≥ 22	< 15
Aztréonam	≤ 1	> 16	30	≥ 27	< 19
Tobramycine	≤ 4	> 4	10	≥ 16	< 16
Amikacine	≤ 8	> 16	30	≥ 17	< 15
Gentamicine	≤ 4	> 4	15	≥ 16	< 16
Colistine	≤ 2	> 4	50	-	-
Ciprofloxacine	≤ 0,5	> 1	5	≥ 25	< 22

Fig. 57: Recommandations 2011 du CA-SFM pour l'interprétation des antibiogrammes de *Pseudomonas aeruginosa*

2.3.2. Considérations pratiques

D'un point de vue pratique, à partir d'une culture de 18-24 heures sur milieu gélosé non sélectif, une suspension normalisée à 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL) est réalisée en milieu Mueller-Hinton (MH) (Sigma) ou en solution saline (eau additionnée de NaCl à 0,9%). Cette suspension est diluée au $1/10^{\text{ème}}$, puis ensemencée par inondation sur la gélose MH (Mueller-Hinton Agar, Biorad) préalablement coulée sur une boîte de Pétri carrée (12x12 mm). Un distributeur d'antibiotiques (16-disk Dispenser, Biorad) permet ensuite de déposer 16 disques imprégnés d'antibiotiques (Antimicrobial susceptibility disks, Biorad). La charge des disques (μg) varie selon les antibiotiques considérés (cf. Fig. 57). Les boîtes sont ensuite incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C. Le lendemain on peut donc évaluer le niveau de résistance de la souche considérée pour chaque antibiotique testé. Ainsi de manière qualitative, plus le diamètre d'inhibition de croissance autour du disque d'antibiotique est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. On mesure ensuite de manière plus précise chaque diamètre (mm) que l'on compare aux valeurs critiques référencées par le CA-SFM (cf. Fig. 57).

2.4. CMI en milieu gélosé

Pour une détermination précise de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque antibiotique, la méthode de dilution en gélose est utilisée. Une série de géloses avec des concentrations décroissantes d'un même antibiotique est réalisée par des dilutions de deux en deux pour chaque antibiotique testé. Dans le cadre de notre étude nous avons sélectionné 8 antibiotiques (Sigma) répartis dans chacune des familles d'antibiotiques :

- la ticarcilline (pénicilline)
- la ceftazidime (céphalosporine de 3^{ème} génération)
- l'aztréonam (monobactame)
- le méropénème et l'imipénème (carbapénèmes, substrats ou non de MexAB-OprM)
- la tobramycine et l'amikacine, deux aminosides
- la ciprofloxacine (fluoroquinolone)

Comme pour les antibiogrammes, une suspension bactérienne normalisée à 0,5 McFarland puis diluée au $1/10^{\text{ème}}$ est réalisée pour chaque souche à tester. Elles sont ensuite transférées sur une microplaque afin d'être distribuées de manière homogène sur chaque gélose grâce à un enseigneur de Steers (Multipontelite™ SCAN 4000, Mast Diagnostic) (cf. Fig. 58). La lecture se fait là aussi après 18h d'incubation à 37°C. La CMI est définie comme la plus faible concentration en antibiotique capable d'inhiber la croissance de la souche étudiée. On retiendra donc comme valeur celle de la première boîte de gélose sur laquelle la souche ne pousse plus.



Fig. 58 : Enseigneur de Steers

2.5. CMI en milieu liquide

2.5.1. Test Polyamine dans les souches de *Pseudomonas aeruginosa*

Pour tester l'effet de la spermine, une polyamine, sur la fonctionnalité d'OprM, nous avons suivi la croissance des souches PAO1WT et PAO1ΔOprM en présence d'un antibiotique substrat et de spermine.

Pour cela, des précultures sont normalisées à 0,5 McFarland puis diluées au $1/100^{\text{ème}}$ dans du milieu MH Calibré. Des cultures sont ensuite réalisées en microplaque 96 puits à partir de 100 µL des précultures préparées auxquels sont

ajoutés 100 μ L de milieu MH +/- le traitement souhaité. Ici, pour chaque souche considérée, des cultures avec une gamme de ticarcilline (Sigma) allant 0,25 à 64 mg/L sont préparées par dilution de 2 en 2 puis la moitié de chacune de ces cultures est additionnée de Spermine (Sigma) à une concentration finale de 1mM alors l'autre moitié sert de contrôle négatif « sans traitement ». Après incubation pendant une nuit à 37°C sous agitation, une estimation visuelle de la CMI peut être faite pour chaque souche (turbidité ou non) ainsi qu'une comparaison entre souche traitée vs. souche non traitée.

2.5.2. Tests vancomycine et cefoxitine dans des souches d'*E. coli*

Avant de vérifier un éventuel influx d'antibiotiques via OprM nous avons réalisé deux expériences contrôles avec deux antibiotiques : la vancomycine et la cefoxitine (Sigma) dans des souches d'*E. coli* délétées respectivement de TolC (*E. coli* Δ TolC) ou d'OmpF et OpmC (*E. coli* Δ OmpR) (cf. Fig. 56).

Le principe est le même que pour les expériences avec la spermine (cf. paragraphe ci dessus) : des cultures de 200 μ L sont préparées avec des concentrations croissantes (de 1 à 256 mg/L) de l'un ou l'autre des antibiotiques et inoculées avec des précultures pour être à $DO_{600nm} = 0,01$. Le niveau de résistance pour chaque antibiotique est déterminé visuellement après une nuit d'incubation à 37°C sous agitation, via la turbidité des cultures. Ces expériences ont également été reproduites en milieu gélosé selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.5 sur la même gamme de concentration qu'en milieu liquide.

2.6. Cultures de *Pseudomonas aeruginosa*

Après transformation de la souche PAO1 Δ OprM électrocompétente par l'un des plasmides de type « pME6001-OprM-mutation » ou le plasmide pME6001 sans insert, un clone isolé sur boîte est utilisé pour ensemercer une préculture de 2 mL de MH + gentamicine à 15 μ g/mL. Cette préculture incubée pendant la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm). Le lendemain, des cultures de 200 mL de milieu MH + gentamicine 15 μ g/mL sont inoculées au 1/50^{ème} à partir de ces précultures. Deux cultures témoins des souches PAO1wt et PAO1 Δ OprM sont également réalisées en

milieu MH sans antibiotique. Les cultures sont incubées à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 1. Les cultures sont alors centrifugées à 7000 g pendant 20 minutes à température ambiante. Les culots sont repris dans 20 mL de Tris pH8 20 mM puis congelés dans l'azote et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation (extraction des protéines de la membrane externe cf. Paragraphe 3.3.1).

2.7. Production des protéines recombinantes chez *E. coli*

Toutes les protéines sont produites dans une souche d'*E. coli* nommée C43(DE3) qui dérive de la souche BL21(DE3) plus communément utilisée. Elle présente l'avantage d'être mieux adaptée à l'expression de certaines protéines membranaires (Miroux and Walker 1996).

Après transformation d'une souche C43 (DE3) électrocompétente par un des plasmides d'expression (de type pBAD33-xxx), un clone isolé sur boîte est utilisé pour ensemercer une préculture de 25 mL de LB + chloramphénicol à 25 µg/mL. Cette préculture incubée pendant la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm) sert à inoculer au 1/50^{ème} un litre de LB + chloramphénicol à 25 µg/mL. Généralement, 6L de cultures sont réalisés en même temps pour obtenir après purification une quantité suffisante de protéine utilisable pour diverses applications. La culture est incubée à 30°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO à 600nm de 0,8. L'expression des protéines est alors induite par ajout de L-Arabinose à une concentration finale de 0,02% (w/v). La culture se poursuit dans les mêmes conditions pendant 2h30 et la DO finale à 600nm est mesurée. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 8000 g pendant 20 minutes à température ambiante puis les culots sont repris dans 50 mL de Tris-HCl pH8 20 mM avant d'être congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3. Biochimie

3.1. Purification des protéines

3.1.1. Purification d'OprM sauvage et mutants

Les culots décrits dans le paragraphe ci-dessus sont décongelés puis lysés à haute pression par six passages à 10 000 psi (69 MPa) sur une presse de French. Le lysat est ensuite centrifugé à 8000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant récupéré est ensuite incubé pendant 30 minutes avec de l'octyl-POE (ou C8POE) (Bachem) à une concentration finale de 2% (v/v). Le C8POE agit de manière similaire à ce qui a été décrit pour le Sarkosyl, qui solubilise préférentiellement la membrane interne d'*E. coli* alors que la membrane externe est résistante à ce traitement (Filip, Fletcher *et al.* 1973). Une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1h à 4°C permet donc ainsi de récupérer un culot correspondant à la fraction de la membrane externe.

Ces membranes sont alors reprises dans 10 mL de Tris-HCl pH 8 20 mM, Glycérol 10% (v/v) avant d'être mises à solubiliser dans une solution de Tris-HCl pH 8 20 mM, Glycérol 10% (v/v), DDM 2% (w/v) pendant une nuit à température ambiante en agitation sur une roue. Cette étape de solubilisation est cruciale dans le processus de purification des protéines membranaires, nous avons donc déterminé de manière empirique que l'efficacité de cette étape nécessitait un volume précis de tampon de solubilisation qui répond à la formule suivante :

Volume de solubilisation (mL) = $[DO_{\text{finale}_{600\text{nm}}} \times \text{volume total de culture (mL)}] / 80$

Ex : Pour 6L de cultures à $DO_{\text{finale}_{600\text{nm}}} = 1,6$ le volume de solubilisation sera donc de : $1,6 \times 6000 / 80 = 120$ mL

Il est important de noter qu'OprM est également efficacement solubilisé par le β -OG, un autre détergent non ionique. Selon le type d'étude nous varions donc le détergent utilisé : le DDM est utilisé pour les études en BN-PAGE alors que le β -OG est préféré pour la cristallisation.

Le lendemain, le solubilisé est ultracentrifugé à 50 000 g pendant 45 minutes à température ambiante. Le surnageant correspondant à la fraction solubilisée est

incubé avec 5 mL de résine NiNTA agarose (Protino® Ni-NTA, Macherey Nagel) pendant 1h30 en agitation sur roue à température ambiante. Les protéines fixées sont ensuite éluées dans un tampon Tris-HCl pH 8 20 mM, Glycérol 10% (v/v), DDM 0,05% (w/v) avec des concentrations croissantes d'imidazole (10, 20, 30, 50, 100 et 400 mM d'imidazole tamponné à pH 8). Le premier lavage à faible concentration d'imidazole est réalisé avec un volume correspondant à 10 fois le volume de résine (10 CV) alors que les autres lavages correspondent à 2 CV. L'élution finale à 400 mM est faite deux fois de manière à être sûr que toute la protéine a bien été éluée. L'élution est suivie par analyse des différentes fractions sur un gel SDS-PAGE 12% (w/v) avec un marqueur de poids moléculaire (ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa), New ENgland Biolabs) servant de référence. La protéine OprM pure est éluée à partir d'une concentration de 50 mM d'imidazole et elle est retrouvée majoritairement dans la fraction à 100 mM d'imidazole (Fig. 59).

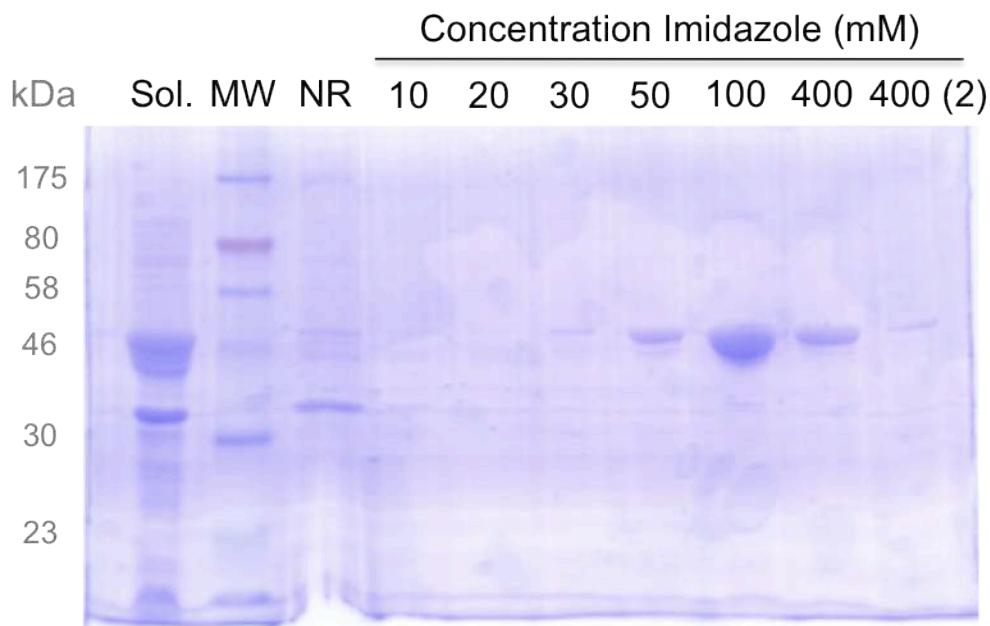


Fig. 59: Analyse des fractions d'élution d'OprM sur gel SDS-PAGE 12% (w/v) après purification sur résine NiNTA

10 μ L de chaque fraction sont déposés dans chaque puits. La fraction correspondant aux protéines de la membrane externe solubilisées, diluée au $1/10^{\text{ème}}$, est déposée dans le premier puits. Le troisième puits correspond à la fraction non retenue (NR) sur la résine NiNTA. L'élution progressive d'OprM par des concentrations croissantes d'imidazole est illustrée dans les puits 4 à 10. Pour repère, un marqueur de poids moléculaire (MW) est déposé dans le second puits.

Une dernière étape de purification sur une colonne de gel filtration Superose6 préparative est réalisée afin de se débarrasser de l'imidazole et de vérifier l'homogénéité de la préparation. Pour cela les fractions de la NiNTA correspondant aux concentrations d'imidazole allant de 50 à 400 mM, sont réunies et concentrées sur un concentrateur Amicon Ultra (Millipore) d'un cut-off de 100kDa par centrifugation à 4000 g à 4°C avant d'être injectées sur la colonne. Le choix de ce cut-off est lié à la stabilité d'OprM sous forme trimérique (~150 kDa) qui permet ainsi d'éviter de concentrer excessivement les micelles de détergent seul (50kDa en moyenne pour le DDM). L'élution de la gel filtration est faite dans un tampon Tris-HCl pH8 20 mM, Glycérol 10% (v/v), DDM 0,05% (w/v). Le profil d'élution montre un seul pic à 73 mL correspondant à OprM pure sous forme trimérique (Fig. 60). Les fractions sous le pic sont concentrées comme décrit ci-dessus jusqu'à une concentration finale de l'ordre de 5 mg/mL.

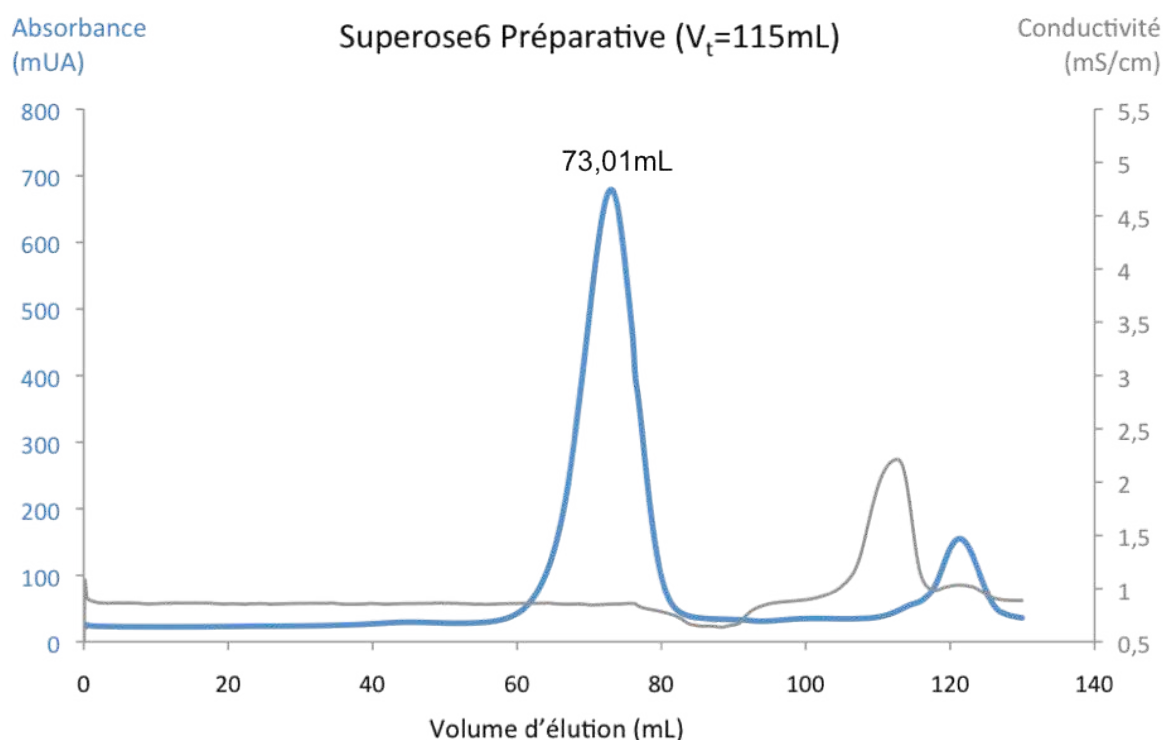


Fig. 60: Profil d'élution d'OprM sur une colonne de gel filtration

3.1.2. Purification de MexA

3.1.2.1. MexAp, forme entière, membranaire

La première étape de lyse suit le même protocole que celui décrit pour OprM. En revanche le surnageant de lyse récupéré après centrifugation est directement ultracentrifugé pendant 1 heure à 100 000 g à 4°C. Le culot recueilli contenant l'ensemble des membranes, est repris dans 10 mL de Tris-HCl pH8 20 mM, Glycérol 10% (v/v) avant d'être mis à solubiliser dans les mêmes conditions que celles utilisées pour OprM.

La première étape de purification sur résine NiNTA est identique à celle décrite pour OprM. L'analyse sur gel SDS-PAGE 12% (w/v) montre que MexAp est éluée uniquement grâce à plusieurs lavages à 400 mM d'imidazole (Fig. 61). Ces fractions sont ensuite concentrées par centrifugation sur un Amicon possédant un cut-off de 30kDa.

L'échantillon est ensuite simplement passé sur une colonne de dessalage (HiPrep 26/10 Desalting, GE Healthcare) pour échanger le tampon contre du Tris pH8 20 mM, Glycérol 10% (w/v), NaCl 200 mM, DDM 0,05% (w/v) puis re-concentré jusqu'à une concentration proche de 5 mg/mL.

3.1.2.2. MexAnp, forme tronquée non palmitylée, cytoplasmique

Cette version tronquée de MexA commence à la Glycine²⁵ située juste en aval de la cystéine qui subit normalement une palmylation nécessaire à l'ancrage de la protéine dans la membrane interne. En l'absence de cette cystéine et de la séquence signal située en amont, la protéine MexAnp est donc produite uniquement dans le cytoplasme. Il suffit donc de la purifier directement à partir du surnageant de lyse contenant l'ensemble des protéines solubles produites par la bactérie. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites pour MexAp.

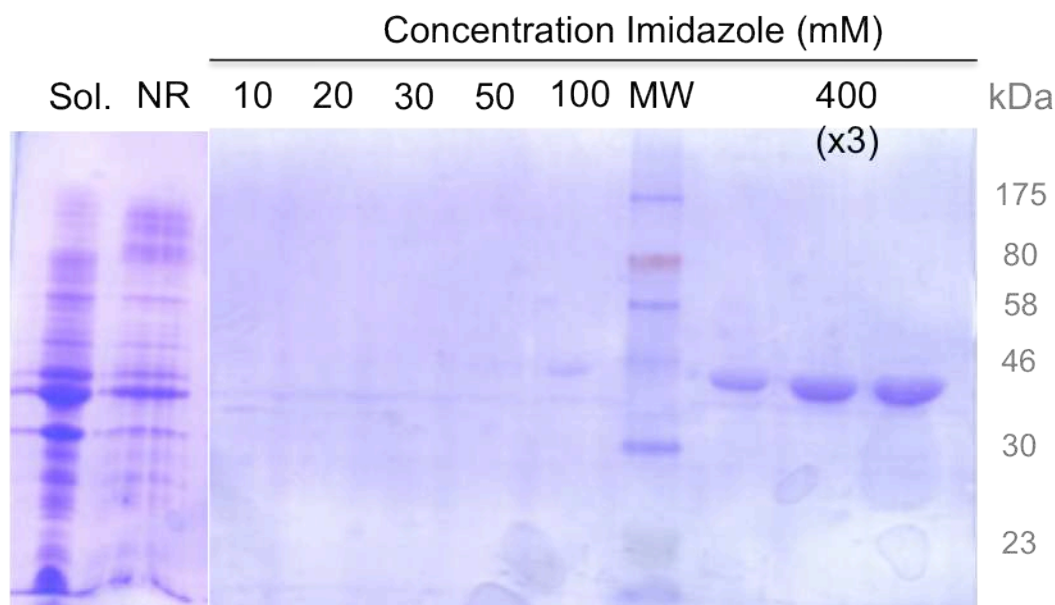


Fig. 61: Analyse des fractions d'élution de MexAp sur gel SDS-PAGE 12% (w/v) après purification sur résine NiNTA

10 μ L de chaque fraction sont déposés dans chaque puits. La fraction correspondant aux protéines membranaires solubilisées, diluée au $1/10^{\text{ème}}$, est déposée dans le premier puits (Sol.). Le deuxième puits correspond à la fraction non retenue (NR) sur la résine NiNTA. Les lavages à des concentrations croissantes d'imidazole sont visibles dans les puits 3 à 7. Pour repère, un marqueur de poids moléculaire (MW) est déposé dans le huitième puits alors que les trois derniers puits illustrent l'élution de MexAp.

3.2. BN-PAGE (Blue Native Gel Electrophoresis)

Le BN-PAGE est une électrophorèse en conditions natives qui reposent sur deux principes : (1) l'utilisation d'un gel en gradient continu d'acrylamide, (2) l'utilisation du bleu de Coomassie G250 qui confère aux protéines une même densité de charge négative sans le dénaturer. Les protéines vont donc migrer dans ce type d'électrophorèse uniquement en fonction de leur masse moléculaire et sous leur forme native.

Dans le cadre de l'étude des pompes d'efflux nous avons dû optimiser le protocole de BN-PAGE décrit initialement par Schägger *et al.* (Schagger and von Jagow 1991).

3.2.1. Préparation du gel gradient

Le gel gradient d'une épaisseur d'1 mm est réalisé au moyen d'une pompe péristaltique. Cette pompe va mélanger progressivement deux solutions contenant de l'acrylamide à des concentrations respectives de 4 et 16% (w/v) afin d'obtenir un gradient continu décroissant entre le bas et le haut du gel. La composition de ces deux solutions est détaillée dans la figure 62. Après polymérisation du gradient, la partie « stacking » du gel est ajoutée de manière similaire aux gels SDS-PAGE.

Composant	Conc. Init.	Conc. Finale	Solution 4%	Solution 16%	Stacking 3,5%
Acrylamide	40%	4 ou 16%	0,3mL	0,8mL	0,175mL
Gel Buffer *	3X	1X	1mL	0,67mL	0,67mL
Glycérol	70%	8%		0,57mL	
H2O		qsp 2 ou 3mL	1,7mL		1,155mL
DDM	10%	0,02%	6µL	4µL	4µL
NaCl	5M	100mM	60µL	40µL	40µL
APS	10%		6,5µL	6,5µL	20µL
Temed			1µL	1µL	2µL
Volume Final			3mL	2mL	2mL

* Gel Buffer : Imidazole pH7,5 75 mM, 6mM acide 6-aminohexanoïque

Fig. 62: Composition des solutions nécessaires pour réaliser le gel gradient 4-16% (w/v) de BN-PAGE

3.2.2. Préparation des échantillons

Nous avons fait le choix de partir des protéines déjà purifiées selon la description faite dans le paragraphe 2.2.

Chaque échantillon est préparé dans 30 µL du tampon suivant : Imidazole pH 7,5 20 mM, Glycérol 10% (w/v), DDM 0,02% (w/v). Nous utilisons une quantité de protéine égale à 100 pmoles pour chaque protéine appartenant aux pompes d'efflux. Les protéines sont étudiées soit seules, afin de déterminer leur état oligomérique, soit en complexes pour déterminer leur stoechiométrie. Dans ce cas, les partenaires sont incubés ensemble à différents ratios.

En parallèle nous utilisons des protéines témoins qui servent d'échelle de masse moléculaire. Parmi ces protéines, deux protéines membranaires : le cytochrome bc1 et la calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique sont produites au laboratoire selon les protocoles décrits par (Ludi and Hasselbach 1985; Berry, Huang *et al.* 1991). Grb2, une protéine soluble de 25kDa est également produite au laboratoire selon le protocole de (Guilloteau, Fromage *et al.* 1996). L'Albumine et l'Apoferitrine sont issus d'un kit de calibration de gel filtration (Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 29,000-700,000 Da, Sigma). 15 µg de ces protéines témoins sont préparés dans le tampon décrit ci-dessus.

Après une incubation de ces échantillons pendant 45 minutes à température ambiante, du bleu de Coomassie G250 (Serva) est ajouté à une concentration finale de 0,02% (w/v) pendant 15 minutes. Les échantillons sont ensuite prêts à être déposés sur le gel gradient.

3.2.3. Migration

Dans la technique de BN-PAGE, l'anode et la cathode ne baignent pas dans les mêmes tampons. Ainsi, le tampon anode est de l'Imidazole pH 7 25 mM alors que deux tampons sont utilisés à la cathode :

- Un tampon cathode « B » : Tricine 50 mM, Imidazole pH 7 7,5 mM, bleu de Coomassie G250 0,02% (w/v).
- Un tampon cathode « B/10 » : Tricine 50 mM, Imidazole pH 7 7,5 mM, bleu de Coomassie G250 0,002% (w/v) i.e. 10 fois moins concentré en bleu G250 que le tampon B.

La migration électrophorétique se déroule à une valeur maximale de 100 V et 10 mA par gel. Elle démarre dans le tampon B puis lorsque le front de migration a atteint 1/3 de la distance, le tampon B est échangé contre le tampon B/10 afin de diminuer le bruit de fond du bleu fixé sur le gel.

A la fin de la migration, les bandes des protéines sont quasiment toutes visibles. Néanmoins, elles sont colorées davantage en baignant le gel dans du bleu G250 en présence d'acide acétique 10% (v/v). La décoloration est ensuite effectuée dans de l'eau additionnée d'acide acétique 10% (v/v).

3.2.4. Deuxième dimension : SDS-PAGE

Lorsque l'on souhaite analyser en détails la formation de complexes bi- ou tripartites observés sur le gel bleu natif entre les composants de la pompe MexAB-OprM, on peut re-dissocier ces complexes pour vérifier la présence de chacun des constituants et les quantifier de manière relative sur un gel SDS-PAGE.

Pour cela, les bandes correspondant aux complexes sont découpées du gel bleu natif avec un scalpel puis incubées pendant 3h à température ambiante dans une solution 1X de Laemmli. Ces échantillons (bande + liquide) sont déposés sur un gel SDS-PAGE avec en parallèle une gamme de concentration de chaque protéine. La migration est effectuée à 60 V le temps que les protéines pénètrent dans le gel puis à 120 V afin de bien séparer les protéines.

3.3. Localisation cellulaire des mutants d'OprM chez *Pseudomonas aeruginosa*

Après avoir déterminé le niveau de résistance aux antibiotiques des différents mutants d'OprM, nous avons souhaité vérifier leur localisation cellulaire lorsqu'ils sont exprimés chez *Pseudomonas aeruginosa* dans la souche PAO1 Δ OprM.

3.3.1. Extraction des protéines de la membrane externe

Les culots cellulaires décrits dans le paragraphe 2.6 sont décongelés puis lysés à haute pression par trois passages à 10 000 psi (69 MPa) sur une presse de French. Le lysat est ensuite centrifugé à 8000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant de lyse récupéré est alors ultracentrifugé à 100 000 g pendant 1h à 4°C. Le culot obtenu, correspondant aux membranes totales est re-suspendu dans 500 μ L de MOPS pH8 15 mM, NaCl 100 mM. Cette étape d'ultracentrifugation est réalisée une deuxième fois dans les mêmes conditions pour bien laver les membranes, et les culots sont repris dans 100 μ L du tampon décrit ci dessus.

Les échantillons sont ensuite dilués dans ce même tampon de façon à obtenir une concentration en protéines totales de 2 μ g/ μ L. Du N-Lauryl Sarcosine

(Sigma) est alors ajouté à une concentration finale de 2% (v/v) et les échantillons sont incubés pendant 20 minutes à température ambiante. Une ultracentrifugation à 40 000 g pendant 30 minutes à 10°C permet enfin d'obtenir un culot correspondant aux membranes externes. Ce culot est repris dans une solution de MOPS pH 8 15 mM, NaCl 100 mM dont le volume est calculé de façon à obtenir une concentration protéique de 20 µg/µL. Les surnageants représentant les protéines de la membrane interne sont conservés tels quels, pour contrôle, à -20°C.

3.3.2. Dosage BCA

Afin de déterminer la concentration protéique dans les préparations membranaires décrites ci dessus, un dosage par la méthode BCA a été effectué (Pierce® BCA Protein Kit). Une gamme étalon de BSA a été réalisée à des concentrations de 5, 50, 100, 150, 200 et 250 µg/mL à partir d'une solution commerciale (Albumin Standard Ampules 2 mg/mL, Sigma). Pour chaque échantillon deux mesures ont été prises correspondant à des dilutions au 1/100^{ème} et 1/200^{ème} dans le cas des membranes totales ou à des dilutions au 1/50^{ème} et 1/100^{ème} dans le cas des membranes internes et externes séparées. Pour cela, 50 µL d'échantillon dilué sont mélangés à 1 mL du réactif BCA puis incubés pendant 30 minutes à 37°C. Une lecture de la DO est ensuite effectuée à 562 nm et la concentration protéique dans les échantillons membranaires déterminée en reportant la valeur de la DO obtenue, sur la droite $DO=f(\text{conc.})$ tracée à partir de la gamme étalon BSA.

3.3.3. Western Blot

Les échantillons membranaires décrits ci dessus, sont déposés sur un gel SDS-PAGE. A la fin de la migration, le gel est lavé dans une solution de Glycine 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,0375% (w/v), 20% éthanol. Le transfert est effectué sur une membrane PVDF (*Polyvinylidène fluoride*) Immun-Blot® (Biorad) grâce à un système semi-sec Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Biorad). Pour cela, le gel est déposé sur la membrane préalablement humidifiée

dans le tampon Glycine et le tout est pris en sandwich entre deux papiers filtres (Blot Absorbent Filter Paper, Biorad). Le transfert dure 30 à 45 minutes sous un voltage limitant de 25 V.

A la fin du transfert la membrane PVDF est rincée dans du TBS (Tris pH 7,5 20 mM, NaCl 140 mM) puis incubée pendant une nuit avec du TBS additionné de lait à 3% (w/v). La membrane est lavée brièvement avec une solution « TBS-T », solution de TBS contenant 0,1% de Tween puis incubée pendant 1 heure avec un anticorps anti-His-HRP (Anti-6X His tag® antibody (HRP), Abcam). Après plusieurs lavages avec la solution TBS-T, la révélation est effectuée par chimioluminescence avec le kit Super Signal® West Pico Substrate (Thermo Scientific) .

4. Modélisation

4.1. Modélisation des mutants cliniques de MexZ

Un modèle de la structure du régulateur MexZ a été obtenu grâce au serveur CPHmodels (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) à partir la structure de TtgR (2UXI) disponible dans la PDB (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Le modèle a été complété dans le programme COOT (Emsley and Cowtan 2004) par ajout d'une séquence ADN mimant la séquence reconnue par MexZ à partir d'une structure de TetR (1QPI). Les représentations permettant de localiser les acides aminés mutés ont été faites avec le logiciel MacPyMol (DeLano Scientific LLC).

4.2. Modélisation des mutants cliniques d'OprD

La structure cristallographique d'OprD ayant été résolue par Biswas *et al.*, en 2007 (Biswas, Mohammad *et al.* 2007) (code pdb 2ODJ) puis améliorée en 2012 par Eren, Vijayaraghavan *et al.* (2012) (code pdb 3SY7), nous avons utilisé directement cette structure pour modéliser les acide aminés mutés retrouvés dans les souches cliniques. Les représentations permettant de localiser les acides aminés mutés ont été faites avec le logiciel MacPyMol (DeLano Scientific LLC).

PARTIE III :

RESULTATS & DISCUSSION

1. Etude de l'interaction OprM-MexA par BN-PAGE

[Article : cf. pages 149-154]

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'étude du fonctionnement des systèmes d'efflux d'antibiotiques est à l'heure actuelle axée sur la compréhension des mécanismes régissant l'assemblage du complexe tripartite. Les études menées sont basées principalement sur des techniques de cross-link *in vivo* et de mutagenèse afin de déterminer les acides aminés impliqués dans les interactions OMF-MFP, RND-MFP ou OMF-RND. L'ensemble des études s'accorde sur le rôle central de la protéine MFP dans la stabilisation des complexes ; toutefois, l'état oligomérique de cette protéine reste controversé. De plus, dans le cadre de l'étude du système d'efflux d'*E. coli* AcrAB-TolC, des mesures biophysiques par ITC ou SPR ont révélé que l'interaction bipartite la plus stable est l'interaction OMF-MFP (Touze, Eswaran *et al.* 2004; Tikhonova, Dastidar *et al.* 2009). Pour l'heure aucune donnée concernant la stoechiométrie de MexA liée à OprM n'est disponible. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'état oligomérique de MexA seule ou en interaction avec OprM par la technique du BN-PAGE.

1.1. Principe du BN-PAGE

Cette technique a été initialement décrite par Schagger and von Jagow (1991) pour séparer les protéines du complexe membranaire mitochondrial OXPHOS, de masse comprise entre 10kDa et 1MDa. Elle a été ensuite largement utilisée au cours de l'ère de la protéomique fonctionnelle pour isoler d'autres complexes membranaires et détecter de nouvelles interactions protéines/protéines (Lasserre, Beyne *et al.* 2006; Katz, Waridel *et al.* 2007). Au fil des ans, plusieurs protocoles ont été développés, ils présentent quelques variantes mais reposent toujours sur les mêmes principes : (1) l'utilisation d'un gel natif en gradient, non dénaturant pour préserver les complexes intacts : c'est le principe du CN-PAGE où les protéines migrent en fonction de leur masse et de leur pI ; (2) l'ajout du bleu de Coomassie G250, après solubilisation des protéines membranaires par un détergent non ionique et non dénaturant. Ce colorant amphiphile chargé négativement, se fixe en de multiples points sur les résidus hydrophobes et basiques. Cela induit un « shift » de charge sur

les protéines, qui vont alors migrer vers l'anode uniquement en fonction de leur masse.

Dans le BN-PAGE, le tampon cathode contient également du bleu de Coomassie afin de s'assurer de la liaison constante du colorant aux protéines et donc permettre leur migration tout au long de l'électrophorèse. Le détergent utilisé pour la solubilisation s'échange contre le Coomassie G250 et les protéines membranaires ainsi liées se comportent comme des protéines solubles en solution. De plus, le fait d'avoir des protéines possédant à leur surface plusieurs charges négatives qui se répulsent, réduit considérablement le risque d'agrégation. D'autre part cette méthode présente l'avantage de ne nécessiter que de très faibles quantités de protéines, contrairement à d'autres techniques telles que l'ultracentrifugation analytique que l'on aurait pu utiliser également pour appréhender l'état oligomérique de nos protéines.

1.2. Choix des protéines de calibration

Puisque les protéines migrent uniquement en fonction de leur masse, grâce à l'utilisation de protéines de référence servant de marqueurs, on peut donc assez facilement estimer les masses moléculaires des complexes et analyser leurs états oligomériques (Schagger, Cramer *et al.* 1994). Le choix des protéines de calibration n'est pourtant pas anodin. Dans cet article de 1994, les auteurs indiquent que certaines protéines solubles disponibles dans le commerce s'intègrent correctement dans la courbe de calibration classique utilisant les protéines membranaires mitochondriales de cœur de bœuf. C'est le cas notamment de la Ferritine, de la Catalase et de l'Albumine. Toutefois, il faut rester très prudent lors de l'utilisation des protéines solubles car leur migration peut varier considérablement par rapport aux protéines membranaires de même masse.

Dans le cadre de notre étude nous avons choisi de réaliser une courbe de calibration à partir d'un mélange de protéines membranaires et de protéines solubles en prenant soin que chaque classe de protéines couvre la gamme de masse considérée dans notre expérience. Nous avons pour cela utilisé deux protéines membranaires que nous avons à disposition au laboratoire : le cytochrome bc1 (500 kDa et 1000 kDa sous ses formes monomériques et dimériques) et la Ca²⁺-ATPase du réticulum

sarcoplasmique (112 kDa). Nous avons ajouté deux protéines solubles validées par les auteurs précédents: l'Apoferritine (443 kDa, 886 kDa et 1329 kDa sous ses formes monomériques, dimériques et trimériques respectivement) et l'Albumine (132 kDa pour le dimère et 198 kDa pour le trimère). Nous avons ainsi vérifié que dans nos conditions expérimentales, protéines membranaires et protéines solubles se comportaient de manière similaire et qu'elles pouvaient parfaitement s'intégrer au sein d'une même courbe de calibration reliant le pourcentage de migration au logarithme de la masse moléculaire (Fig. 63).

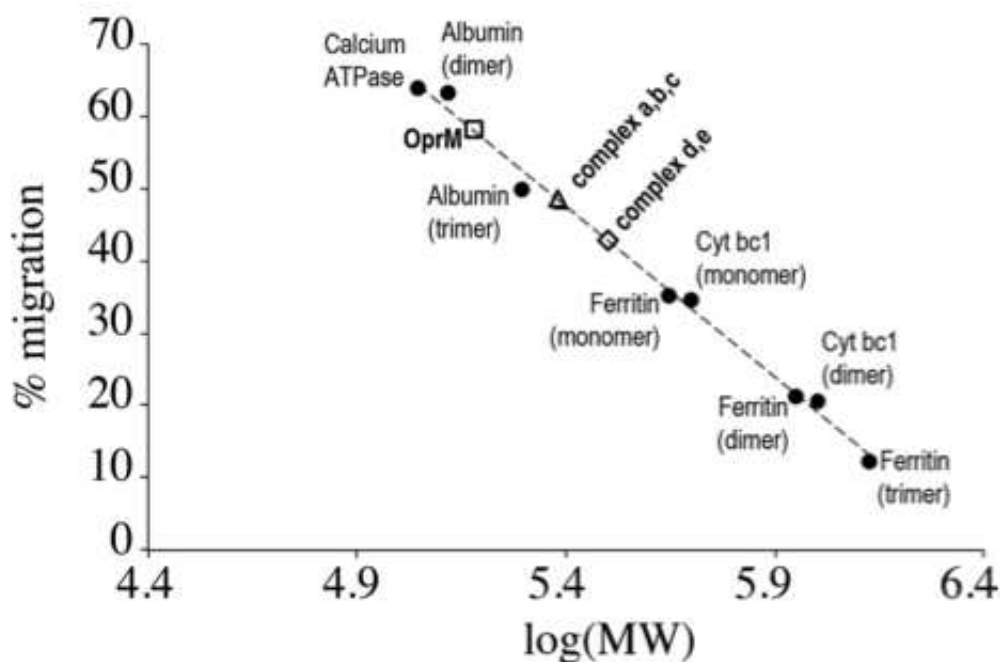


Fig. 63: Courbe de calibration montrant la migration de protéines standards
(Issu de Ferrandez, Monlezun *et al.* 2012)

1.3. Importance du détergent

Bien que cette technique permette d'isoler en une étape des complexes membranaires, nous avons choisi de travailler à partir des protéines recombinantes exprimées dans *E. coli*, solubilisées en dodécylmaltoside (DDM) puis purifiées par des méthodes chromatographiques. Afin d'éviter toute variation ou biais dans les interprétations, il est important que toutes les protéines soient purifiées dans le même détergent. Nous avons opté pour le DDM qui fait partie des trois détergents recommandés pour les expériences de BN-PAGE (avec le Triton X-100 et la Digitonine). En effet, comme tous les détergents non ioniques il permet de dissocier préférentiellement les interactions lipides-lipides et lipides-protéines contrairement aux détergents ioniques qui rompent les liaisons protéines-protéines ou intra-protéines (Reisinger and Eichacker 2008). Des protéines solubilisées par des détergents ioniques tels que le SDS ne seraient donc plus dans leur état natif et le BN-PAGE ne présenterait plus aucune utilité pour étudier ces protéines.

Pour former les complexes entre OprM et MexA nous avons donc incubé ensemble les protéines purifiées à des ratios de 1:1, 1:2 et 1:3 (moles/moles) avant de les analyser en BN-PAGE. Nos premiers essais se sont révélés infructueux car nos protéines migraient sous forme de bandes diffuses (« smear »). Nous avons donc optimisé le protocole en ajoutant du DDM dans le gel afin de minimiser toute agrégation non spécifique. Le choix de ce détergent n'est pas aléatoire. En effet, initialement nous avons voulu réaliser cette étude avec de l'octyl- β -D-glucopyranoside (β -OG) car la protéine OprM ne cristallise qu'en présence de ce détergent. Malheureusement, il s'est vite avéré que le β -OG n'était pas adapté pour cette technique car les protéines agrégeaient fortement en sa présence et ne pouvaient pas du tout entrer dans le gel, bien qu'il s'agisse d'un détergent non ionique. Nous expliquons ce phénomène par un mauvais échange de ce détergent par le bleu de Coomassie G250 contrairement à ce qui a été démontré pour le DDM (Heuberger, Veenhoff *et al.* 2002).

1.4. Identification des complexes et analyse de la stoechiométrie

Afin d'identifier les complexes formés nous avons fait migrer en parallèle les protéines de manière individuelle (Fig. 64 pistes 3 et 4). Nous avons ainsi pu déterminer leur masse de 152,2 kDa pour OprM, majoritairement trimérique, et 79,1kDa pour MexA, qui existe donc à l'état dimérique. Il est à noter que la partie basse du gel ne répond plus à la linéarité de la courbe de calibration et nous avons donc établi la masse de MexA sur un gel 8-16% plus adapté pour les protéines de 25 à 150 kDa.

Les pistes 6 à 8 correspondent aux différents ratios OprM-MexA testés. Elles permettent de mettre en évidence l'apparition de nouvelles bandes (notées a à e) par rapport à celles des protéines seules. Leur distance de migration reportée sur la courbe de calibration nous permet de déterminer des masses de complexes de 240,8 kDa et 317,1 kDa que l'on peut attribuer à des complexes 6:3 et 8:3 respectivement entre MexA et OprM. En revanche lorsqu'on utilise une version tronquée non palmylée de MexA, on perd toute interaction avec OprM, montrant l'importance de cette région N-terminale dans la stabilisation de la MFP.

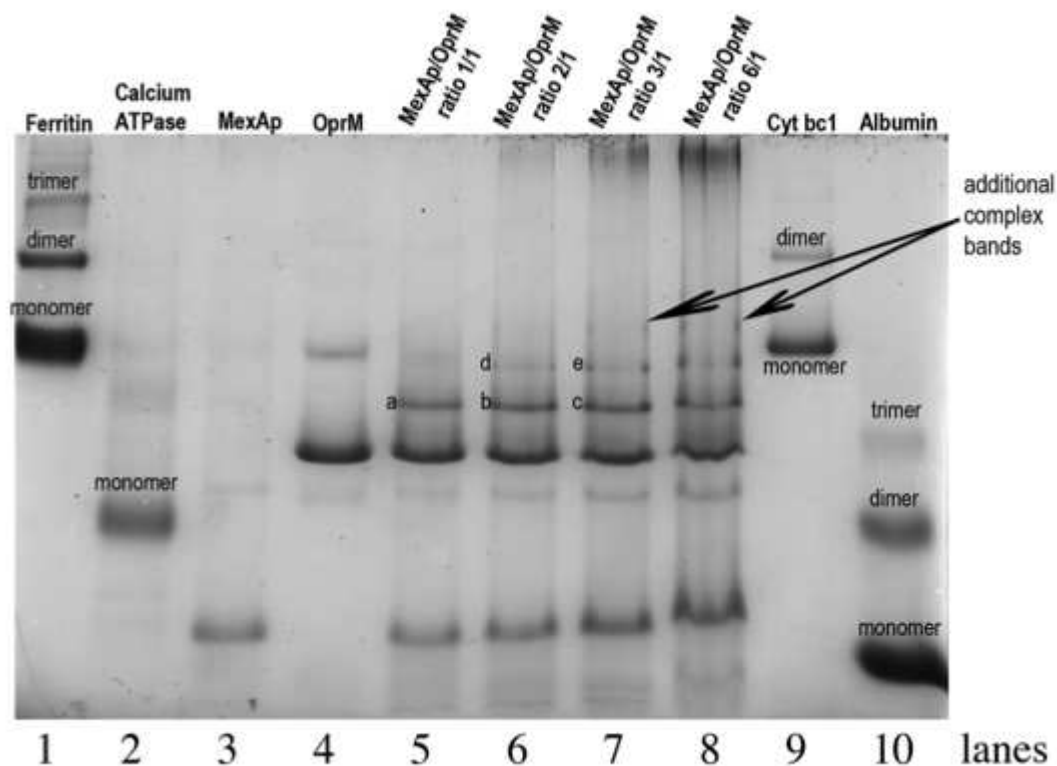


Fig. 64: Analyse des complexes OprM-MexA par BN PAGE

(Issu de Ferrandez, Monlezun *et al.* 2012)

Toutefois afin de s'assurer que les bandes de hauts poids moléculaires correspondent bien à des oligomères de complexes bipartites nous avons réalisé un gel SDS-PAGE dans une deuxième dimension pour dissocier les protéines. Grâce à une gamme étalon de chaque protéine, déposée sur ce même gel, nous avons confirmé par densitométrie qu'un trimère d'OprM pouvait fixer deux (bandes a, b, c) ou quatre (bandes d et e) molécules de MexA.

Les bandes supérieures correspondent à 6 ou 8 molécules de MexA par trimère d'OprM mais elles étaient de trop faible intensité pour être analysées en gel SDS-PAGE. Nous pouvons néanmoins en déduire que la fixation de la MFP sur la protéine OMF se fait sous forme de multiples de 2 uniquement. Il est vraisemblable que l'association des trois composants des systèmes d'efflux soit dynamique et que des complexes oligomériques supérieurs puissent se former et se dissocier. Malheureusement le BN-PAGE ne nous permet pas de répondre à cette question car

ce n'est pas une méthode à l'équilibre, les concentrations variant au cours de la migration.

Cependant, nous avons pu montrer l'intérêt de cette technique, relativement simple, facile à mettre en œuvre et ne nécessitant que peu d'échantillon pour analyser la stœchiométrie des constituants de systèmes d'efflux membranaires. Nous prévoyons à présent d'analyser le complexe tripartite dès lors que nous arriverons à stabiliser MexB sous sa forme trimérique en BN-PAGE. Enfin, cette technique sera un outil de choix pour tester rapidement la capacité de mutants d'un des trois composants à interagir avec ses partenaires.

Yann Ferrandez^{1,*,**}
 Laura Monlezun^{1,**}
 Gilles Phan^{1,*,**}
 Houssain Benabdelhak²
 Philippe Benas¹
 Nathalie Ulryck¹
 Pierre Falson³
 Arnaud Ducruix¹
 Martin Picard¹
 Isabelle Broutin¹

¹Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, France

²Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

³Laboratoire des Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), Université Claude Bernard, Lyon, France

Received October 14, 2011

Revised December 9, 2011

Accepted January 9, 2012

Research Article

Stoichiometry of the MexA-OprM binding, as investigated by blue native gel electrophoresis

Multidrug resistance has become a serious concern in the treatment of bacterial infections. A prominent role is ascribed to the active efflux of xenobiotics out of the bacteria by a tripartite protein machinery. The mechanism of drug extrusion is rather well understood, thanks to the X-ray structures obtained for the *Escherichia coli* TolC/AcrA/AcrB model system and the related *Pseudomonas aeruginosa* OprM/MexA/MexB. However, many questions remain unresolved, in particular the stoichiometry of the efflux pump assembly. On the basis of blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) (Wittig et al., *Nat. Protoc.* 2006, 1, 418–428), we analyzed the binding stoichiometry of both palmitylated and non-palmitylated MexA with the cognate partner OprM trimer at different ratios and detergent conditions. We found that β -octyl glucopyranoside (β -OG) detergent was not suitable for this technique. Then we proved that MexA has to be palmitylated in order to stabilize the complex formation with OprM. Finally, we provided evidence for a two by two (2, 4, 6, or upper) binding of palmitylated MexA per trimer of OprM.

Keywords:

Active efflux / Membrane protein complexes / Multidrug resistance / Stoichiometry determination

DOI 10.1002/elps.201100541

1 Introduction

Gram-negative bacteria have developed an armory of strategies to shield themselves against antibiotics. At the front line, there is the active efflux through the double membrane bilayer. The present study deals with the constitutive efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. In this bacterium the efflux complex consists of the following: (i) MexB (3 × 113 kDa) embedded in the inner membrane and responsible for the active transport (energized by the proton motive force), (ii) OprM (3 × 51 kDa), an exit channel composed of a β -barrel inserted in the outer membrane and of a bundle of α -helices along the periplasmic space, and (iii) MexA (38 kDa), a periplasmic anchored lipoprotein of the MFP family (membrane fusion protein), whose putative role is to stabilize the whole complex although the exact function remains to be properly addressed. Both in *Escherichia coli* [1,2] and *P. aeruginosa* [3–5], significant progress has been made on the charac-

terization of the regions involved in the assembly of the MFP with its two other partners, but the exact stoichiometry of this interaction is still debatable. Such information appears crucial for the understanding of the assembly mechanism, in particular the MFP interaction with the outer membrane channel. Indeed, this interaction is the most stable within the whole system [6, 7] and moreover, the MFP oligomerization is a precondition to the proper assembly of the pump [8].

To our knowledge, no experimental evidence has been obtained to address the stoichiometry of MexA bound to OprM. Based on crystal structures of MexA, two models have been proposed, consisting of six or 12 MexA molecules for one model [9], and nine MexA molecules for the other model [10]. In addition, Fernandez-Recio and collaborators have suggested a model of efflux for which three AcrA molecules would attach to OprM [11], whereas Narita and collaborators have estimated a 2:1:1 stoichiometry (MexA/MexB/OprM) in a single-cell analysis [12]. More recently, a 1:1:1 tripartite model from a distance constraint simulation based on cross-linking experiments was proposed by Symmons et al. [13], but to date there is still no consensus on the oligomeric state of the MFP protein in this assembly.

Correspondence: Dr. Isabelle Broutin, Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Université Paris Descartes, UMR 8015 CNRS, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France
E-mail: isabelle.broutin@parisdescartes.fr
Fax: +33153739925

Abbreviations: BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis; DDM, dodecyl maltoside; MFP, membrane fusion protein; β -OG, β -octyl glucopyranoside

*Current address: ANSES/ENVA Unité BIPAR 23, avenue du Général de Gaulle 94706, MAISONS-ALFORT Cedex, France.

**These authors contributed equally to this work.

***Current address: Institute of Structural and Molecular Biology, University College London and Birkbeck College, Malet Street, London, UK.

The purpose of the present study is to bring evidence of MexA stoichiometry in complex with OprM and to characterize the importance of MexA palmitylation in this process using blue native polyacrylamide gel electrophoresis [BN-PAGE; 14–16], a methodology which proved reliable for the determination of the oligomeric state of membrane proteins [17].

2 Materials and methods

2.1 Reagents

Coomassie Blue G250 was from SERVA, 6-aminohexanoic acid and tricine were from Sigma. Imidazole was from Merck. Acrylamide and bisacrylamide were purchased from Bio-rad. β -Octyl glucopyranoside (β -OG) and dodecyl maltoside (DDM) were from Anatrace. Albumin and Apo-Ferritin were purchased from Sigma (HMW calibration kit). Gels were digitalized and intensity of the bands was quantified with the LAS-4000 mini (FujiFilm).

2.2 Sample preparation

OprM, MexAp, Calcium ATPase, and Cytochrome bc1 membrane proteins as well as Grb2 soluble protein were produced, solubilized, and purified as described previously [18–21], and [22] respectively.

A truncated form of MexA “cysteine-less”, named MexAnp, with the first 24 amino acids deleted, was generated in order to obtain a non-palmitylated and soluble version of this protein. For that purpose we amplified MexAnp gene from *P. aeruginosa* (PAO1 strain) genomic DNA with the following primers: “A-5'-NdeI-SC”: ggaattccatattgggaaaagcgaggcgccg, and “A-3'-XbaI-HC”: tgctctagatcagtgatggatggatggcccttgctgctggttttcgc. The polymerase chain reaction (PCR) fragment generated (with a poly-histidine tag at the C-terminus, italicized) was digested with NdeI and XbaI (sites underlined) and then cloned in the expression vector pBAD33-GFP (Benabdelhak et al., unpublished data, [23]). The overproduction and purification of MexAnp were performed as for MexAp [19].

Proteins were incubated at different concentrations within imidazole 7.5 mM pH 7.5, glycerol 10% (v/v), and DDM 0.02% (v/v) (or 0.1% β -OG), together with Coomassie Blue (0.02%). Classically, 100 pM of our membrane proteins and 10 μ g of calibration proteins (ApoFerritin, calcium ATPase, cytochrome bc1, and albumin) are loaded in each well.

2.3 Gel preparation and electrophoresis conditions

Native gels were prepared as described in [14]. They consisted of a gradient separating gel (with acrylamide:bisacrylamide ratio ranging from 4% to 16% w/v or 8% to 16% w/v), gradually casted with a peristaltic pump, and a stacking gel (acrylamide:bisacrylamide ratio of 3.5% w/v). 6-Aminohexanoic

acid 0.25 M and 0.02% DDM (or 1% β -OG) were also added into the gel.

“Deep blue” cathode buffer B consisted of 50 mM tricine, pH 7.5, 7.5 mM imidazole, 0.02% Coomassie Blue G250. “Light blue” cathode buffer B/10 was made similar to cathode buffer B but with a ten times lower dye concentration (0.002% Coomassie Blue G250). Electrophoresis was performed at constant voltage of 120 V (15 mA limiting). Cathode buffer B was removed after one-third of the whole electrophoresis run (about 30 min) and then exchanged with the buffer “light blue” so that the excess of dye could be removed from the gel thereby minimizing the blue background staining of the gel.

When indicated, proteins complex bands were extracted from the BN-PAGE by cutting them thoroughly with a scalpel, incubated for 3 h with a 1X Laemmli buffer solution at room temperature and then subsequently heated for 5 min at 100°C. Eluted protein was then loaded on a Laemmli SDS-PAGE [24] together with OprM and MexA proteins at five different concentrations for further densitometry calibration. When too many complex bands had to be analyzed, several gels were run for each OprM/MexA concentration range (as it is of main importance for the calibration) and the samples were loaded, stained, and destained at the same time.

3 Results

3.1 Identification of the various oligomeric complexes, by means of blue native gel electrophoresis

We have formed [MexAp]_x:[OprM]_y complexes by incubating MexAp and OprM at various molar ratios, namely 1:1, 2:1, and 3:1. The different possible complexes were then separated as a function of their molecular mass by electrophoresis under non-denaturing conditions. This experiment was performed several times to verify the reproducibility of the method. One example of such analysis is presented in Fig. 1A. We have used the BN-PAGE methodology for which migration is performed in the absence of SDS (*ergo* complexes are not disrupted). In theory, the mere presence of Coomassie Blue dye is sufficient to stabilize the protein throughout the electrophoresis, including membrane proteins. However, in the absence of detergent in the gel, migrations appeared smeary and, consequently, impossible to evaluate. We have resorted to the addition of detergent into the gels in order to minimize nonspecific aggregation. It has proven extremely helpful to add DDM, a mild non-denaturing detergent, into the gel so that formation of nonspecific complexes is prevented (data not shown). By contrast, when β -OG was added instead of DDM, proteins aggregated readily and could not even enter the gel. Somehow, it seems that β -OG is an efficient protein solubilizer and stabilizer in solution but a poor cargo as far as electrophoresis is concerned. When subjected to BN-PAGE, the protein is supposed to exchange its detergent swimwear for the Coomassie Blue dye. This exchange has been shown to be very rapid in the case of DDM-solubilized proteins [17].

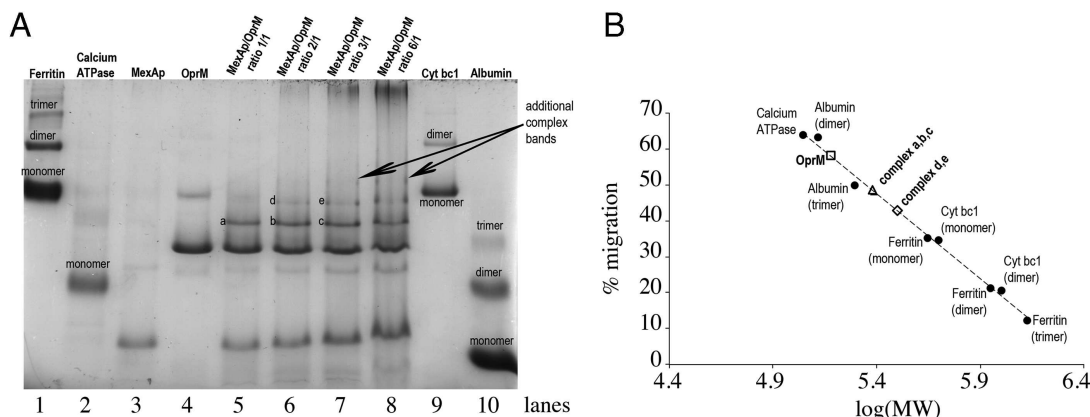


Figure 1. Identification of the various $[\text{MexAp}]_x:[\text{OprM}]_y$ oligomeric complexes. (A) Blue native gel electrophoresis separation of the various complexes between MexAp and OprM. (B) Standard curve showing the migration of known proteins standards. Soluble proteins: Albumin (Mw = 132 kDa (dimer), 198 kDa (trimer)), ApoFerritin (Mw = 443 kDa (monomer), 886 kDa (dimer), 1329 kDa (trimer)). Membrane proteins: Calcium ATPase (Mw = 112 kDa), cytochrome bc1 (Mw = 500 kDa (monomer), 1000 kDa (dimer)). The different complexes from (A) are transcribed on the curve.

It could very well be that β -OG is much less prone to such an exchange. This latter assumption shall be investigated further.

Most importantly, we have checked that, in our conditions, BN-PAGE renders possible the protein separation over a molecular weight range consistent with the theoretical mass of our complexes. To that end, proteins of known molecular masses were also loaded on the gel: the standard high molecular weight soluble proteins ApoFerritin (Fig. 1A, lane 1) and albumin (lane 10), as well as calcium ATPase membrane protein (lane 2) and cytochrome bc1 membrane protein (lane 9). All of them exist in several already characterized oligomeric forms facilitating the calibration. Indeed protein migration was observed as a linear function of the logarithmic molecular weight (Fig. 1B). It is to be noticed that proteins migrating beyond calcium ATPase monomer were not taken into account, as the bottom part of the gel does not exhibit a linear relationship.

The control with OprM alone shows a trimer of 152.2 kDa (theoretical value is $3 \times 50.87 = 152.6$ kDa) with a small contribution from a trimer of trimer (i.e., 9 OprM monomers) (Fig. 1A, lane 4). Concerning MexAp, as it migrates in the nonlinear part of the gel, its characterization was performed on a different BN-PAGE with an acrylamide/bisacrylamide ratio ranging from 8 to 16% w/v (data not shown). Proteins of apparent molecular size ranging from 25 to 150 kDa were used as calibrants for that purpose, namely Grb2 (25 kDa), albumin (66 kDa [monomer] and 132 kDa [dimer]), and calcium ATPase (112 kDa). This gel resulted in the characterization of MexAp as a dimer of 79.1 kDa (to be compared to the theoretical value $2 \times 38.59 = 77.18$ kDa).

As concerning the preformed $[\text{MexAp}]_x:[\text{OprM}]_y$ complexes (see lane 5 ratio 1:1, lane 6 ratio 2:1, and lane 7 ratio 3:1), several bands were observed in addition to those corresponding to the migration of unbound MexAp (lane 3) or OprM (lane 4). Among them, five have been boxed for clarity

and named from a to e in Fig. 1A. Additional bands could be seen above the band e on lanes 7 and 8 (see arrows in Fig. 1A) but they were not intense enough to be analyzed with accuracy by the second method described below. Nevertheless, among the different BN-PAGEs performed, these bands were always present and could be assigned to 6:3 and 8:3 MexAp:OprM oligomeric ratio by the migration fraction analysis. In lane 8, corresponding to an incubated MexAp:OprM ratio of 6:1, the migration was clearly slowed down, especially for uncomplexed MexAp, and was not interpretable. This is due to the high concentration of protein in the lane, which constitutes a limit to the method.

3.2 Analysis of the stoichiometry of the complexes

Determination of the stoichiometry of the $[\text{MexAp}]_x:[\text{OprM}]_y$ complexes is deduced from the latter BN-PAGE by estimating the number of MexAp molecule per OprM trimer that are required to match the observed molecular weight. Migration of complexes a, b, c (240.8 ± 4.75 kDa calculated from the different incubated ratio from three different gels), d, and e (317.1 ± 8.83 kDa) could correspond to complexes that are formed from 1 OprM trimer + 2 MexAp (240.8 kDa to be compared to the theoretical value $152.6 + 2 \times 38.6 = 229.8$ kDa) and 1 OprM trimer + 4 MexAp (317.1 kDa to be compared to the theoretical value $152.6 + 4 \times 38.6 = 307$ kDa), respectively (Fig. 2D).

However, it is important to ascertain that observed complexes involved $[\text{MexAp}]_x:[\text{OprM}]_y$ oligomers. As shown in Fig. 2C, we confirmed this when the native complexes separated by BN-PAGE (bands a–e) were extracted from the gel and then subjected to gel electrophoresis under denaturing conditions (the upper bands of complex [see arrows on lines 7 and 8, Fig. 1A] were not intense enough to be analyzed by this method). Thus, a stoichiometry of 2/4/6/8 and even

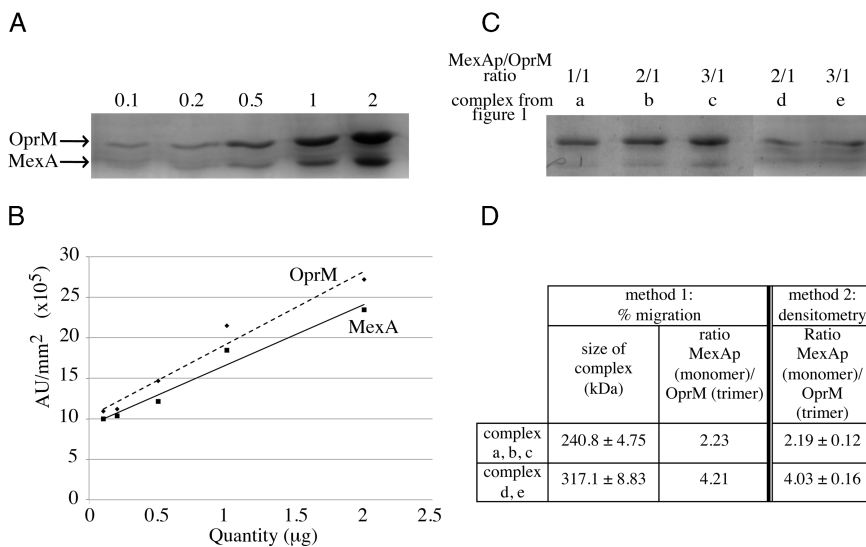


Figure 2. Quantification of the stoichiometry of OprM and MexAp within the various complexes. (A) SDS-PAGE showing the migration of known amounts of MexAp and OprM. (B) Densitometry calibration curve of the different bands from (A). (C) SDS-PAGE of proteins eluted from the BN-PAGE shown in Fig. 1A (bands a to e) run together with the proteins range presented in (A). (D) Summary of the different complex sizes obtained by the two methods analysis (average of three experiments).

more MexAp for one OprM trimer seems likely. To cross-check that the latter stoichiometries are relevant, we quantified the amount of MexAp and OprM from the various $[\text{MexAp}]_x:[\text{OprM}]_y$ oligomers that were separated by the denaturing gel. It was thereby possible to deduce their relative abundance since the intensity of each band is proportional to the actual amount of the respective proteins. First, a calibration curve was plotted after loading known amounts of MexAp and OprM on an SDS-PAGE and then plotting the corresponding density of each band as a function of the actual amount loaded on the gel (see Fig. 2A and B). It was then possible to estimate the amount of MexAp and OprM in the various complexes (loaded on the same gel) and to calculate their molarity. Since it is well known that OprM acts functionally as a trimer, the stoichiometry of interaction can be estimated. We found that MexAp binds to OprM in a number of discrete values and only in a dimeric form (Fig. 2D).

3.3 Comparison between palmitylated and non-palmitylated MexA

In addition to the stoichiometric analysis of preformed complexes, the BN-PAGE method can be easily employed to compare the behavior of modified proteins with the wild type. MexA protein is anchored to the membrane via the palmitylation of its *N*-terminus cysteine, the role of which is unclear. In order to investigate its implication in the formation of MexA/OprM complexes, non-palmitylated MexA (MexAnp) was incubated with several different amounts of OprM in the same conditions as for the MexAp. As shown in Fig. 3, no additional bands are visible in the lanes of the different incubation that could be assigned to complex formation. Thus, we concluded that the palmitate plays an important role in the formation of MexA/OprM complex.

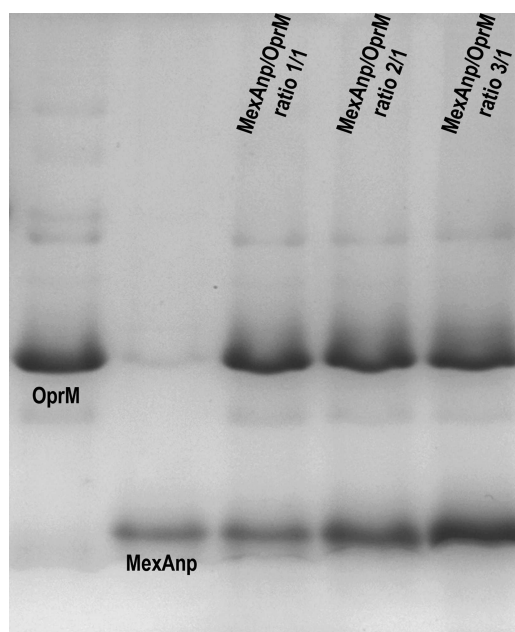


Figure 3. Analysis of various $[\text{MexAnp}]_x:[\text{OprM}]_y$ incubated ratio for the non-palmitylated (np) form of MexA.

4 Discussion

BN-PAGE is an efficient method for characterizing biological systems under their native states. Versatility and relative simplicity make this technique very widely used. However, the following simple precautions need to be considered:

- Solubilization of membrane proteins is influenced by detergent–lipid, detergent–protein, lipid–protein, and protein–protein interactions, but the reverse may also be true. Poorly adapted solubilization conditions can result in nonbiological assemblies. Lately, Reisinger and

Eichacker [25] stressed that extreme care must be taken regarding the solubilization conditions for the extraction of the protein out of its membrane bilayer. This recommendation is especially relevant in the case of solubilized protein that shall be investigated by BN-PAGE. In practice, a good balance of protein and detergent ratio must be found in order to strip out all the lipids that would prone an aberrant migration, without denaturing the protein. In our case, we used the same solubilization conditions as two previous studies aiming at monitoring the dynamics of protein–protein interactions, OprM, and MexA among others (see [26] and [4]). Along the same line, the same solubilizing conditions were chosen for purifying and crystallizing OprM [18].

- (ii) Detergents are unavoidable for membrane protein solubilization but can dramatically affect protein architecture, protein function, but also protein–protein interactions. This is especially true in the case of membrane proteins where oligomerization involves transmembrane regions [27], but this caveat does not hold in our case because MexA/OprM binding occurs in the periplasmic area and only involves the soluble parts of the proteins.
- (iii) Detergent or dye bound to the transmembrane part of the protein have specific effects on mass and stability of the protein. From this point of view, analytical ultra-centrifugation (AUC) may also appear adequate, although much less versatile and rapid than BN-PAGE. It has been shown previously that the oligomeric state of membrane transporter is well reflected by blue native electrophoresis [17]. The problem with the AUC methodology is the important requirement in terms of amount and purity of the proteins. By contrast, BN-PAGE is of great advantage since it is a reliable and a simple method to assay quaternary structure of protein in their detergent-solubilized state. Furthermore, it has been shown that once extracted out of the BN-PAGE gel, membrane proteins remain active (see also [14]).

Our analysis of MexA:OprM complex by BN-PAGE shows that two, four, six, eight, or even more MexAp molecules may bind one OprM trimer. Such an even stoichiometry contrasts with the intrinsic odd symmetry of the efflux system. Nevertheless, this result is consistent with a previous work showing MexA preexisting as a dimer [3]. In addition, crystal structure of MexA showed interaction between two molecules suggesting the presence of a constitutive dimer, and crystal structure of AcrA [28] showed a dimer per asymmetric unit. Size-exclusion experiments also tend to show that MexA is dimeric in solution (not shown). Furthermore, we have previously shown by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) that the MexAp/OprM assembly involves two or six MexAp molecules depending on the pH [4]. The latter is consistent with the structure of the MacA/TolC complex, part of the macrolide-specific efflux pump MacAB-TolC, recently determined by electron microscopy [29] for which a funnel like

assembly of six MacA is proposed to make a bridge between the dimeric inner membrane protein MacB and the trimeric TolC. The same value was obtained for CusB in the X-ray structure complex with the inner membrane protein CusA, part of the CusBA-CusC heavy-metal efflux pump of *E. coli* [30]. One cannot exclude that the association between the three components of this family of efflux pump is dynamic, involving a two by two complex formation of the periplasmic protein onto the outer membrane one. Whether association is dynamic or not is unfortunately beyond BN-PAGE analysis because electrophoresis is not an equilibrium method: concentration changes during the migration. Whether or not higher oligomeric species are observed depends on the kinetics of association and dissociation of the complex. Thereby, one must not exclude that higher oligomeric species could exist. It was previously postulated that MexA could form a ring encompassing 12 monomers, an assembly that was hypothesized to clamp MexB-OprM assembly [10].

Finally, our analysis of MexAp/OprM complex by BN-PAGE shows no interaction between the two proteins. Little information exists in the literature on the role of this palmitate. Complementation studies performed in MexA[−] *P. aeruginosa* strains indicated that neither MexA lipid modification nor MexA membrane anchoring are essential for its function [31]. More recently, the role of this lipidation was investigated for AcrA binding to AcrB by surface plasmon resonance, showing that it stabilizes the MP domain of AcrA and increases its affinity for AcrB [32]. Inhere BN-PAGE analysis, the MexB partner is missing, making the comparison inappropriate. Nevertheless, it can be hypothesized that MexAp affinity for OprM is not high enough for the complex to stabilize in absence of the palmitate when MexB is missing.

Therefore, our results shed light on the assembly of the efflux pump although we now need to switch to the whole OprM-MexA-MexB assembly.

We wish to thank Dr. Josiane Thierry and Pr Thierry Prangé for their comments of the manuscript. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-07-blanc-263). G.P. was supported by a fellowship from French government and L.M. by a grant of Vaincre la Mucoviscidose.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Gerken, H., Misra, R., *Mol. Microbiol.* 2004, 54, 620–631.
- [2] Lobedanz, S., Bokma, E., Symmons, M. F., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 4612–4617.
- [3] Reffay, M., *UFR de Physique : Constituants Élémentaires et Systèmes Complexes*, Université Paris VI – Pierre et Marie Curie, Paris 2007, p. 247.
- [4] Reffay, M., Gambin, Y., Benabdelhak, H., Phan, G., Taulier, N., Ducruix, A., Hodges, R. S., Urbach, W., *PLoS ONE* 2009, 4, e5035.

- [5] Eda, S., Masada, H., Yoshihara, E., Nakae, T., *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, **254**, 101–107.
- [6] Mokhonov, V. V., Mokhonova, E. I., Akama, H., Nakae, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, **322**, 483–489.
- [7] Touze, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V., *Mol. Microbiol.* 2004, **53**, 697–706.
- [8] Nehme, D., Li, X. Z., Elliot, R., Poole, K., *J. Bacteriol.* 2004, **186**, 2973–2983.
- [9] Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A., Nakae, T., *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, 25939–25942.
- [10] Higgins, M. K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, **101**, 9994–9999.
- [11] Fernandez-Recio, J., Walas, F., Federici, L., Venkatesh Pratap, J., Bavro, V. N., Miguel, R. N., Mizuguchi, K., Luisi, B., *FEBS Lett.* 2004, **578**, 5–9.
- [12] Narita, S., Eda, S., Yoshihara, E., Nakae, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, **308**, 922–926.
- [13] Symmons, M. F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, **106**, 7173–7178.
- [14] Schagger, H., von Jagow, G., *Anal. Biochem.* 1991, **199**, 223–231.
- [15] Swamy, M., Siegers, G. M., Minguet, S., Wollscheid, B., Schamel, W. W., *Sci. STKE* 2006, **2006**, pl4.
- [16] Wittig, I., Braun, H. P., Schagger, H., *Nat. Protoc.* 2006, **1**, 418–428.
- [17] Heuberger, E. H., Veenhoff, L. M., Durkens, R. H., Friesen, R. H., Poolman, B., *J. Mol. Biol.* 2002, **317**, 591–600.
- [18] Broutin, I., Benabdelhak, H., Moreel, X., Lascombe, M. B., Lerouge, D., Ducruix, A., *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2005, **61**, 315–318.
- [19] Trepout, S., Taveau, J. C., Mornet, S., Benabdelhak, H., Ducruix, A., Lambert, O., *Eur. Biophys. J.* 2007, **36**, 1029–1037.
- [20] Ludi, H., Hasselbach, W., *Biochim. Biophys. Acta* 1985, **821**, 137–141.
- [21] Berry, E. A., Huang, L. S., DeRose, V. J., *J. Biol. Chem.* 1991, **266**, 9064–9077.
- [22] Guilloteau, J. P., Fromage, N., Ries-Kautt, M., Reboul, S., Bocquet, D., Dubois, H., Faucher, D., Colonna, C., Ducruix, A., Becquart, J., *Proteins* 1996, **25**, 112–119.
- [23] Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., Beckwith, J., *J. Bacteriol.* 1995, **177**, 4121–4130.
- [24] Laemmli, U. K., *Nature* 1970, **227**, 680–685.
- [25] Reisinger, V., Eichacker, L. A., *J. Proteomics* 2008, **71**, 277–283.
- [26] Gambin, Y., Lopez-Esparza, R., Reffay, M., Sieracki, E., Gov, N. S., Genest, M., Hodges, R. S., Urbach, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, **103**, 2098–2102.
- [27] Grandier-Vazeille, X., Guerin, M., *Anal. Biochem.* 1996, **242**, 248–254.
- [28] Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H. I., Ghosh, P., *Structure* 2006, **14**, 577–587.
- [29] Xu, Y., Song, S., Moeller, A., Kim, N., Piao, S., Sim, S. H., Kang, M., Yu, W., Cho, H. S., Chang, I., Lee, K., Ha, N. C., *J. Biol. Chem.* 2011, **286**, 13541–13549.
- [30] Su, C. C., Long, F., Zimmermann, M. T., Rajashankar, K. R., Jernigan, R. L., Yu, E. W., *Nature* 2011, **470**, 558–562.
- [31] Yoneyama, H., Masada, H., Kamiguchi, H., Nakae, T., *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 4628–4634.
- [32] Tikhonova, E. B., Yamada, Y., Zgurskaya, H. I., *Chem. Biol.* 2011, **18**, 454–463.

2. Etude par électrophysiologie de l'ouverture de la porine OprM

[Article : cf. pages 166-171]

2.1. Pertinence de l'étude

Résolue dans différents groupes d'espace (R32, C2, P2₁2₁2₁) (Akama, Kanemaki *et al.* 2004; Phan, Benabdelhak *et al.* 2010), la structure cristallographique d'OprM est très proche de celle de TolC (rmsd de 2,3 Å) malgré la faible identité de séquence entre ces deux protéines (19%). Dans toutes les structures natives décrites, ces porines se trouvent dans une conformation « fermée » à chacune de leurs extrémités. Il semble qu'il s'agisse de la conformation la plus stable en l'absence des protéines partenaires et/ou de ligands et cet état paraît tout à fait compatible avec la nécessité d'une membrane externe peu perméable afin de préserver l'intérieur de la cellule de l'entrée des xénobiotiques. L'ouverture de la porine ne doit se produire que de manière transitoire durant le transport des antibiotiques.

Ces longues protéines « canal », tout comme les porines exclusivement membranaires, constituent de véritables pores hydrophiles dans la membrane permettant le passage passif de molécules. Elles se prêtent donc bien à des mesures d'activité en tant que canaux ioniques par des techniques d'électrophysiologie. Le principe de ces études est de mesurer le changement de conductance de la membrane suite à l'insertion de ces protéines.

Plusieurs études ont ainsi déjà été reportées sur des formes sauvages ou mutés de TolC (Andersen, Hughes *et al.* 2002; Andersen, Koronakis *et al.* 2002; Andersen, Koronakis *et al.* 2002) mais très peu de données sont disponibles à l'heure actuelle pour OprM. C'est pourquoi nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Bruno Lepioufle à l'ENS Cachan qui développe des biopuces dans le but d'étudier des protéines membranaires insérées dans des membranes suspendues reconstituées, biomimétiques des bicouches lipidiques.

2.2. Bref état de l'art de l'électrophysiologie des canaux ioniques

2.2.1. Les bicouches lipidiques artificielles classiques

Contrairement aux méthodes de patch-clamp qui étudient les protéines dans leur environnement cellulaire naturel, les bicouches lipidiques artificielles, composées de phospholipides purifiés ou synthétisés, représentent un modèle simplifié de membrane pour l'étude individuelle de protéines membranaires sous leur forme active. Ces systèmes existent principalement sous deux formes : des vésicules lipidiques sphériques comprenant un compartiment interne aqueux appelées liposomes (dont nous ne parlerons pas ici) et des bicouches planes ou BLM (*black lipid membrane*) formées au travers d'une minuscule ouverture sur un support solide.

Deux méthodes conventionnelles permettent de former ces bicouches planes, elles sont dénommées « Painting method » (Mueller, Rudin *et al.* 1962) et « Langmuir-Blodgett method » (Montal and Mueller 1972). La première repose sur le dépôt d'une solution lipidique (phospholipides dans un solvant organique) au niveau de l'ouverture d'un support hydrophobe en Teflon de 50 à 500µm séparant deux compartiments aqueux. La bicouche se forme spontanément au niveau de l'interface phase organique/phase aqueuse (Fig. 65A). Dans la seconde méthode chaque compartiment contient une monocouche de lipides spontanément orientée au niveau de l'interface air/phase aqueuse et la bicouche se forme verticalement au niveau de l'orifice lors de l'augmentation du volume de tampon dans chaque compartiment (Fig. 65B).

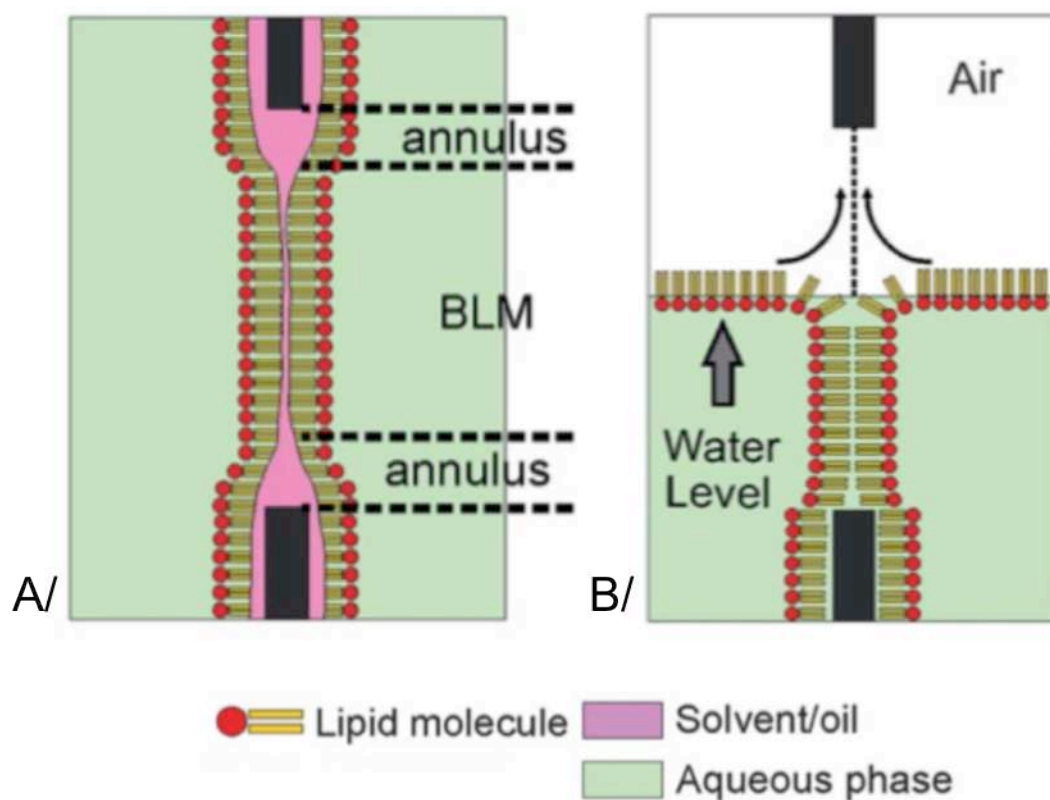


Fig. 65: Techniques conventionnelles de formation des bicouches planes artificielles suspendues

(Issu de Zagnoni 2012)

(A/) *Technique de painting* (B/) *Méthode Langmuir-Blodgett*.

Les protéines membranaires sont ensuite incorporées par diffusion passive ou fusion de vésicules (cf. paragraphe 2.2.4).

2.2.2. Vers la miniaturisation et le criblage haut débit

Les canaux ioniques sont impliqués dans de nombreuses maladies (qualifiées de « channelopathies ») (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott 1999) et les protéines membranaires représentent d'ailleurs actuellement plus de la moitié des cibles de des médicaments présents sur le marché mondial (Adams, Worth *et al.* 2012). A des fins thérapeutiques, de nouveaux outils ont donc dû être développés pour étudier ces protéines de manière plus automatisée et pouvoir réaliser des tests de criblage à plus haut débit sur des puces.

Un des problèmes de la fabrication des bicouches artificielles décrites précédemment est le manque de répétabilité et la fragilité des BLM. De nombreux efforts ont finalement permis d'obtenir des ouvertures micro-usinées dont le diamètre réduit et précisément contrôlé (μm à nm) a grandement augmenté la résistance des bicouches lipidiques. Le recours à la microfluidique assure par ailleurs un contrôle plus précis des volumes délivrés et favorise donc la reproductibilité. D'autre part, le fait de miniaturiser les techniques de patch clamp permet de suivre en parallèle différentes conditions sur une même puce (Osaki, Suzuki *et al.* 2009; Ota, Suzuki *et al.* 2011).

2.2.3. Les canaux ioniques « modèles »

La mise au point de ces différentes technologies a nécessité l'utilisation de canaux ioniques modèles. La plupart des études utilisent des peptides ou des protéines disponibles commercialement et stables en solution que nous décrivons brièvement ci-dessous.

Les canaux ioniques peptidiques sont composés de monomères de moins de 50 acides aminés et sont à la fois des agents antimicrobiens et des toxines. Parmi les plus utilisés, on retrouve la gramicidine A et l' α -alaméthicine. La gramicidine est un peptide linéaire de 15 résidus issu de *Bacillus aneurinolyticus* qui s'assemble au sein de la bicouche en hélice β pour former finalement un canal dans les membranes lipidiques grâce à l'orientation antiparallèle de deux monomères. Le pore de 4 Å ainsi formé présente une grande sélectivité pour les cations monovalent (conductivité : $\text{H}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$). L'alaméthicine est un

peptide amphipathique en hélice α de 20 acides aminés qui forme un canal ionique voltage dépendant grâce à la l'association de 4 à 6 molécules. Ce peptide de *Trichoderma viride* est perméable aux cations et aux anions (Yin, Burns *et al.* 2003).

La seule protéine utilisée régulièrement en électrophysiologie est l' α -hémolysine. Cette protéine heptamérique de 33kDa forme un tonneau β au sein des membranes qui reste ouvert en conditions normales. De plus, elle présente l'avantage d'être stable sur une grande gamme de pH et de températures et son insertion ne nécessite pas de conditions ioniques particulières (Steller, Kreir *et al.* 2012).

2.2.4. Insertion des canaux ioniques

Deux techniques permettent d'insérer les canaux ioniques au sein d'une bicouche préformée. Dans le premier cas, les protéines doivent être solubilisées par un détergent avant d'être ajoutées d'un côté de la bicouche lipidique en vue de son insertion de manière spontanée (Fig. 66A). L'autre méthode consiste à reconstituer la protéine dans des liposomes avant de les faire fusionner avec la bicouche lipidique préformée (Fig. 66B). La formation de protéoliposomes est réalisée par ajout d'un excès de lipides à la solution de protéine solubilisée en détergent puis élimination du détergent par dialyse, dilution ou par l'ajout de BioBeads® (billes de polystyrène capables d'adsorber dans des solutions aqueuses les substances apolaires ou les agents actifs de surface dont la masse est inférieure à 2000 Da).

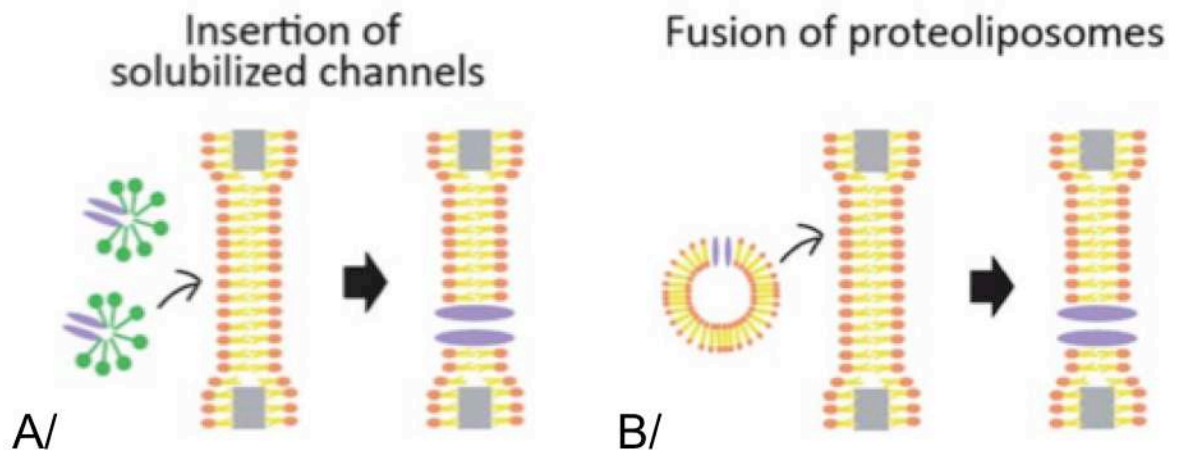


Fig. 66: Procédures d'insertion des canaux ioniques dans une bicouche
(Issu de Demarche, Sugihara *et al.* 2011)

2.3. Etude électrophysiologique d'OprM par microfluidique

2.3.1. Description du dispositif utilisé

Le système de puce microfluidique mis au point par l'équipe de Bruno Lepioufle comprend deux couches de PMMA (PolyMethylMethAcrylate) séparées par un fin film de parylène. La partie supérieure du PMMA comprend une chambre servant de réservoir de tampon et dans laquelle est insérée l'électrode de mesure alors que la partie inférieure du PMMA est un canal fluide permettant l'injection des solutions (lipides et tampons). Ce canal contient également l'électrode de référence (Fig. 67). Le film de parylène présente une micro-ouverture de 20 à 100 μm pour la formation de la bicouche lipidique.

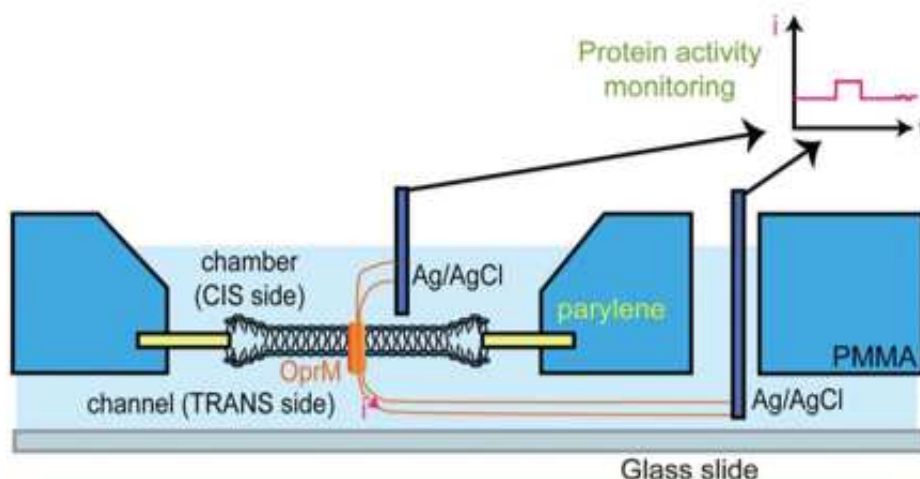


Fig. 67: Coupe transversale du système microfluidique utilisé pour mesurer l'activité d'OprM

(Issu de Wang, Monlezun *et al.* 2012)

La configuration de ce système présente l'avantage de former la bicouche lipidique parallèlement au support permettant ainsi de suivre directement cette formation au microscope sans marquage du fait de la transparence du support (Ide and Yanagida 1999; Ide, Takeuchi *et al.* 2002). De plus, l'utilisation du PMMA permet de réduire le bruit lié au support. Ceci est primordial car on cherche à détecter le courant d'un système proche de la molécule unique, qui est de l'ordre

du pico-ampère (pA). Ainsi avec du PMMA on obtient un bruit de l'ordre de 0,17 pA contre 56 à 105 pA pour un support plus classique en silicone/parylène (Suzuki, Tabata *et al.* 2007).

2.3.2. Formation de la bicouche lipidique

Afin de former une bicouche à une interface aqueuse/aqueuse, la chambre supérieure est remplie du tampon utilisé pour la purification de la protéine mais sans détergent (50 mM de phosphate de sodium, 100 mM NaCl, 10% Glycérol, pH 7,5) puis une solution lipidique de 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocoline (DPhPC) dans un mélange décane/hexanol est ajoutée dans la partie canal. Cette injection de solution lipidique est immédiatement suivie de celle d'une solution de tampon afin de forcer le déplacement des lipides non intégrés dans la bicouche. Grâce à l'orientation préférentielle des lipides entre tampon et solvant organique, la bicouche apparaît alors spontanément en moins de dix minutes et de manière reproductible (> 90% des cas) et peut être mise en évidence électriquement par l'apparition d'une capacitance moyenne de $0,58 \mu\text{F}.\text{cm}^{-2}$ dans les conditions expérimentales. L'utilisation d'un solvant mixte décane/hexanol permet d'accélérer la formation (l'amincissement) de la bicouche et de réduire la quantité de solvant restant dans la bicouche (Osaki, Suzuki *et al.* 2009) qui pourrait ensuite gêner l'insertion de la protéine. La méthode de préparation des bicouches décrite ici représente une avancée par rapport aux précédents travaux, puisque ceux ci utilisaient la pression hydrostatique pour le contrôle de la formation des BLM (Suzuki, Tabata *et al.* 2006; Suzuki, Tabata *et al.* 2007).

La bicouche est également visible optiquement et on peut noter la présence d'une bordure nommée Plateau de Gibbs (Fig. 68A) correspondant à deux monocouches de lipides dès lors que les puces utilisées ont une ouverture supérieure à 40 μm , comme dans le cas dans nos expériences où l'ouverture est de 45 μm . Enfin, le diamètre de la bicouche varie de 20 à 40 μm selon le voltage appliqué (20 à 120 mV) (Fig. 68 A à C).

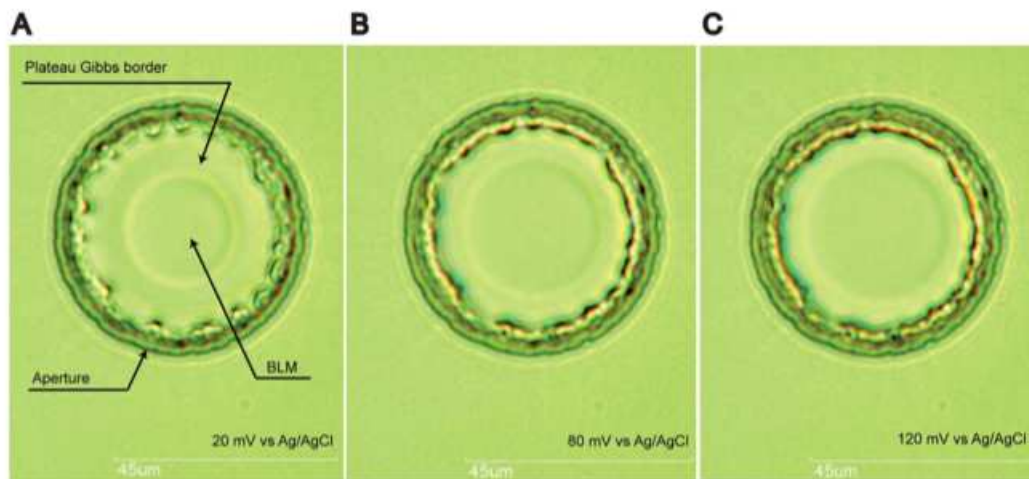


Fig. 68: Visualisation de la formation de la bicouche lipidique au niveau de l'ouverture de parylène
(Issu de Wang, Monlezun *et al.* 2012)

2.3.3. Activité d'OprM

2.3.3.1. Mise en évidence de l'insertion

Nous avons inséré avec succès OprM des deux côtés de la bicouche lipidique en changeant la polarité du voltage appliqué selon l'orientation choisie. Dans les deux cas nous avons pu mesurer une augmentation rapide de la conductance à 1250 pS (Fig. 69) et l'activité d'OprM peut ainsi être suivie pendant plus de 30 minutes. Après cette insertion stable d'OprM, on peut alors déceler de rapides petits sauts d'activité d'une centaine de pS sur au moins 5 niveaux (Fig. 70). Nous attribuons ces variations à des changements conformationnels au niveau des hélices qui sont nécessaires à l'ouverture de la porine, de manière similaire à ce qui a été décrit pour TolC (Andersen, Hughes *et al.* 2002).

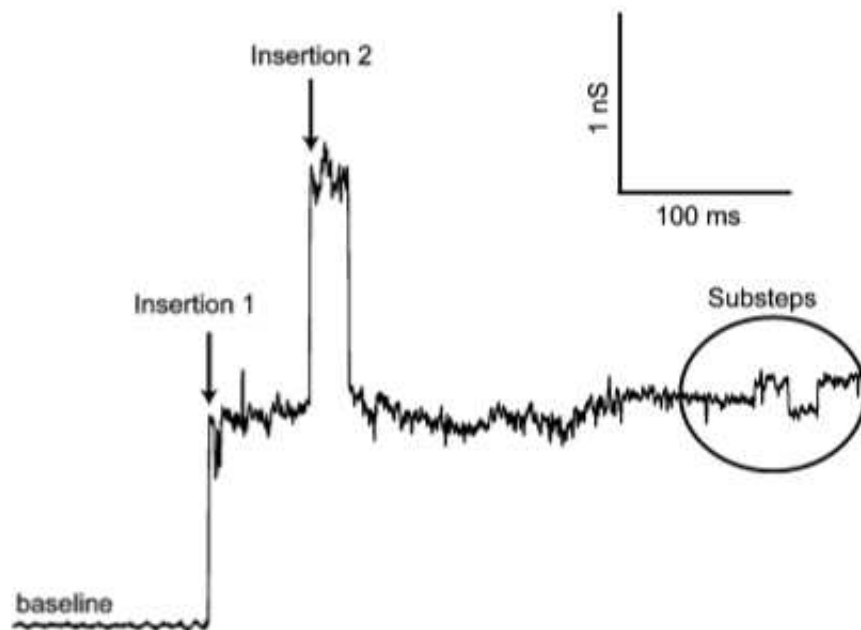


Fig. 69: Exemple d'enregistrement électrique de l'insertion d'OprM au sein de la bicouche avec le système microfluidique
(Issu de Wang, Monlezun *et al.* 2012)

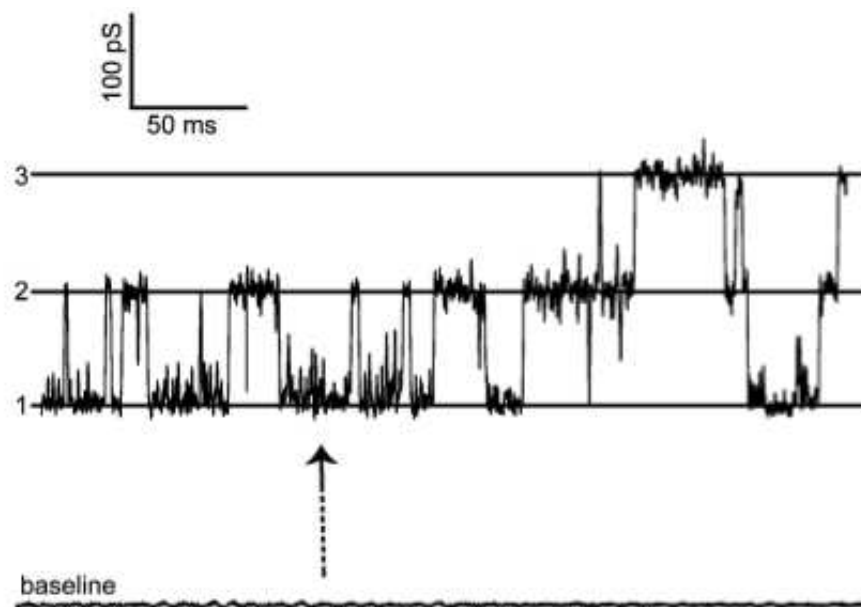


Fig. 70: Caractérisation électrique des sous-états d'activité d'OprM
(Issu de Wang, Monlezun *et al.* 2012)

2.3.3.2. Influence des conditions expérimentales

Au travers de toutes les expériences accumulées, nous avons pu mettre en évidence l'importance de la composition du tampon sur l'activité mesurée. En effet, nous obtenons des valeurs différentes de conductance en fonction du sel utilisé : 1250 pS avec du NaCl 150 mM contre 380 pS pour du KCl 150 mM. OprM semble donc présenter une sélectivité pour le sodium. Toutefois, nous avons également observé une augmentation de la conductance lorsque l'on augmente la concentration de KCl sur une gamme de 150 mM à 1 M pour atteindre une valeur de 726 pS, similaire à la valeur de 850 pS déjà décrite dans la littérature pour une force ionique identique (Wong, Brinkman *et al.* 2001), validant les valeurs obtenues avec notre système biomimétique.

Par ailleurs, nous avons vu que l'application d'un potentiel positif est nécessaire au maintien d'OprM dans la bicouche lors de l'injection de la protéine par le canal. Ceci peut s'expliquer par l'asymétrie dans la répartition des éléments de structure secondaire de ce type de porine, pour lesquelles la partie membranaire en tonneau β ne représente qu'une faible partie de la protéine.

Finalement, nous avons validé pour la première fois la faisabilité de l'insertion au sein d'une bicouche artificielle reconstituée en système microfluidique, d'un type de protéine canal plus complexe que celles décrites jusqu'alors (Fertig, George *et al.* 2003; Le Pioufle, Suzuki *et al.* 2008; Kawano, Osaki *et al.* 2010). Nous envisageons à présent une utilisation plus régulière de ce système pour tester l'influence de mutation sur l'ouverture d'OprM (cf. chapitre suivant) ou dans des projets plus ambitieux que nous essayons de mettre au point dans l'équipe, qui visent à reconstruire la pompe entière MexAB-OprM afin d'étudier son activité *in vitro*.

Cite this: *Analyst*, 2012, **137**, 847

www.rsc.org/analyst

PAPER

Activity monitoring of functional OprM using a biomimetic microfluidic device

Wei Wang,^{†a} Laura Monlezun,^{†b} Martin Picard,^b Philippe Benas,^b Olivier Français,^a Isabelle Broutin,^{‡*b} and Bruno Le Pioufle^{‡*a}

Received 24th October 2011, Accepted 2nd December 2011

DOI: 10.1039/c2an16007b

This paper describes the fabrication and use of a biomimetic microfluidic device for the monitoring of a functional porin reconstituted within a miniaturized suspended artificial bilayer lipid membrane (BLM). Such a microfluidic device allows for (1) fluidic and electrical access to both sides of the BLM and (2) reproducible membrane protein insertion and long-term electrical monitoring of its conductance (G_i), thanks to the miniaturization of the BLM. We demonstrate here for the first time the feasibility to insert a large trans-membrane protein through its β -barrel, and monitor its functional activity for more than 1 hour (limited by buffer evaporation). In this paper, we specifically used our device for the monitoring of OprM, a bacterial efflux channel involved in the multidrug resistance of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Sub-steps of the OprM channel conductance were detected during the electrical recordings within our device, which might be due to oscillations between several structural conformations (sub-states) adopted by the protein, as part of its opening mechanism. This work is a first step towards the establishment of a genuine platform dedicated to the investigation of bacterial proteins under reconstituted conditions, a very promising tool for the screening of new inhibitors against bacterial channels involved in drug resistance.

1. Introduction

The study of the conductance of bacterial ion channels is highly important for the research in pharmacology as they are crucial in active efflux, one of the main mechanisms involved in the resistance of bacteria to antibiotics.¹ Two different classes of porins exist respectively responsible for the influx and the efflux across the outer membrane of Gram negative bacteria.^{2–4} Even though the first porin has been described in 1970 and our knowledge concerning this family of proteins continually progressed since that time, several questions still remain open regarding their function, especially on their opening mechanism.

In the case of the Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, four different efflux pumps have been characterized. One of them is the OprM/MexA/MexB complex which is reversibly assembled to allow for the transport across the two membranes

of the bacteria. OprM, a porin part of the OMF (Outer Membrane Factor) family, is inserted into the external membrane (Fig. 1a).

The crystallographic structure of OprM has already been presented with various resolutions.^{5,6} It has been proposed that

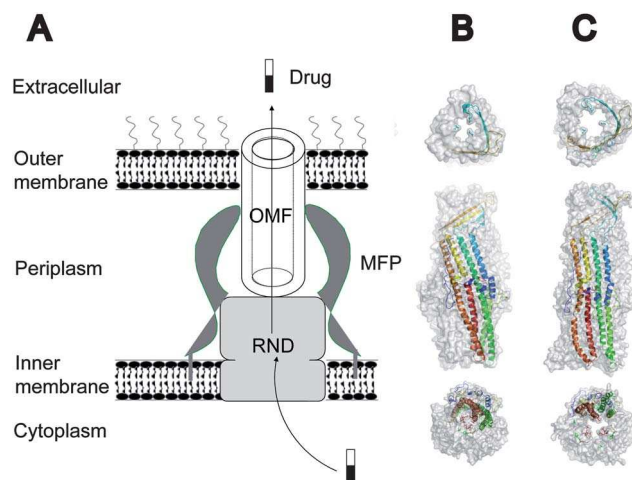


Fig. 1 (A) Schematic representation of an efflux pump from the type I transporter family. MFP: membrane fusion protein, RND: resistance nodulation cell division. (B) Closed and (C) open states of the OprM porin.

^aSATIE, UMR 8029 CNRS, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 Avenue du Président Wilson, 94235 Cachan Cedex, France. E-mail: bruno.lepioufle@satie.ens-cachan.fr

^bLaboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR 8015 CNRS, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France. E-mail: isabelle.broutin@parisdescartes.fr

[†] Wei Wang fabricated the microfluidic devices, performed BLM formation, ion channel insertion, electrical monitoring and signal processing of its activities. Laura Monlezun prepared all the membrane protein samples used in the study.

[‡] Co-corresponding authors.

the opening of OprM could be due to a twist movement, equivalent to that of a photographic diaphragm,⁷ combined with an extension movement, involving the cooperative reorganization of key residues at both ends (Fig. 1b and c).⁶

The activity of porins and channels is classically addressed by measuring the change of membrane conductance after insertion of proteins in an artificial bilayer separating two compartments.⁸ Micro-technologies have been developed to miniaturize the aperture, thus permitting the reconstruction of an artificial bilayer lipid membrane (BLM), as it benefits to its stability.^{9–13} In that case the artificial BLM can be connected to a microfluidic structure.¹⁴ The functionality of such miniaturized biosensors was proved previously by using model ion channel peptides (gramicidin or alamethicin) and α -hemolysin.^{12,15,16} Nevertheless, results obtained with these model peptides cannot illustrate the difficulties that can be encountered when investigating actual porin proteins. Indeed, the insertion of OprM through its β -barrel, which represents only a third of the protein length, is totally different from the extremely stable insertion of α -hemolysin with its large stabilizing rubber rings.

We demonstrate in this paper through repeatable conductance measurements that single native OprM channel insertion can be achieved reproducibly by using our microfluidic device. Moreover the microscaled dimension of the artificial bilayer allows long-term monitoring of the conductance of OprM.

After the initial insertion of OprM, correlated with a significant step in terms of conductance increase, fluctuation of the conductance between several sub-steps could be clearly identified. These fluctuations might be due to oscillations between several conformations of the protein, presumably of its internal helix bundles, which lead to variations of the conductance.

This work contributes to a better understanding of OprM activity, which is an important step prior to the next challenge that will be the screening of chemical compounds for the discovery of new inhibitors of the bacterial efflux pumps.

2. Experiment section

2.1. Design and fabrication

The structure of the microfluidic device used in this work, which is inspired from the microarray design described before,¹² is briefly summarized hereafter. The chip is based on two bonded PMMA layers separated by a parylene film. A picture of the device within the experimental setup is shown in Fig. 2a, while a schematic view is represented in Fig. 2b.

The top PMMA substrate includes a chamber for buffer reservoir and access for the recording electrode as shown in Fig. 2c. A recess in this top substrate allows the alignment of the self-standing parylene film (Fig. 2a). The bottom PMMA substrate has a fluidic channel for liquid injection (lipid and buffer), of which top and bottom faces are defined by the parylene film and a microscope cover glass, respectively (thickness = 170 μ m). Micrometer-sized apertures have been etched in the parylene film, enabling lipid bilayer formation (Fig. 2c). The fabrication process of the microfluidic chip relies on three main steps described as follows.

Firstly, parylene film is deposited on a single-crystal silicon substrate by the chemical vapor deposition technique at

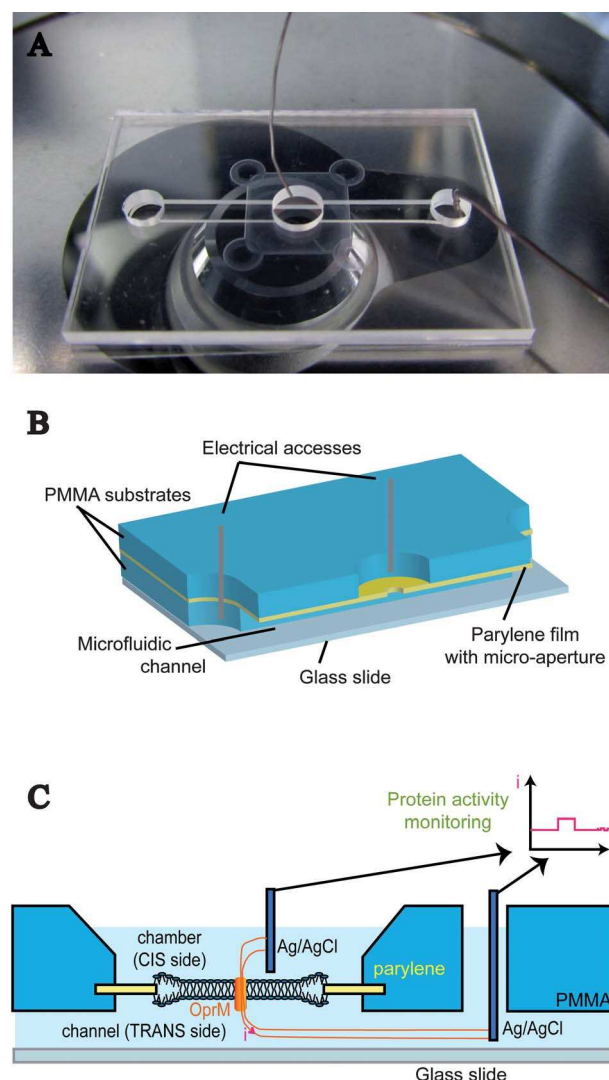


Fig. 2 Microfluidic biomimetic device: (A) view of the microfluidic device on the microscope stage, (B) scheme of the structure of the device. A thin film of parylene previously micromachined is sandwiched between two PMMA plates in which are machined the *CIS* chamber and *TRANS* fluidic access and channel. (C) Crosssection: an ion channel reconstituted in the BLM within the microfluidic chip is electrically monitored by using a patch clamp amplifier.

a thickness of 10 μ m. Holes are then etched in the film by RIE oxygen plasma using an aluminium mask as a protective layer. After removing the aluminium, the parylene film (with micro-apertures from 20 to 100 μ m diameter) is peeled off from the silicon substrate using tweezers. The thickness of parylene film is optimized by combining the considerations of easy peeling and BLM formation.

Secondly, the PMMA substrates are machined using simple drilling and milling techniques to obtain the bottom plate including the fluidic channel ($W = 2$ mm, $H = 0.5$ mm, $L = 25$ mm) and the top plate including the chamber ($\varnothing = 4$ mm, $H = 1.5$ mm), and a recess for the alignment with parylene film (8.1 mm \times 8.1 mm \times 0.1 mm).

The third step concerns the full packaging of the device. The UV sensible adhesive layer (NOA 73, Norland products, NJ

USA) was used to bond the parylene film between the two PMMA substrates. A microscope cover glass was finally glued to close the bottom channel.

Several prototypes with varying aperture diameters were fabricated. The final choice of the aperture diameter depends on the stability and sealing resistance of the BLM. In the case of the recordings presented in this paper, the diameter was set to 45 μm .

2.2. Reagents

For the lipid solution, 25 mg of 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) or 1- α -phosphatidylcholine (PC) (Avanti Polar Lipids, U.S.A.) dissolved in 1 mL or 500 μL of mixed solvents of *n*-decane (20%, 50% or 100% in v/v) and 1-hexanol (80%, 50% or 0% in v/v) was used. For the buffer solution of the experiments performed with Na^+ ions, 50 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl, and 5% (v/v) glycerol at pH = 7.5 were used. For the experiments performed with K^+ ions, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 5% (v/v) glycerol at pH 7.5, and either 150 mM KCl or 1 M KCl were used as buffer. Stock solutions of OprM were diluted down to 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the respective buffers complemented with 0.45% (w/v) Octyl- β -D-glucopyranoside (βOG) before use.

2.3. Expression, purification and preparation of the protein

Vector pBAD33-GFPuv was used to heterologously express and purify OprM with a C-terminal 6-histidine tag, from the *Escherichia coli* C43-DE3 strain as described previously.⁶ Cultures were performed at 30 $^{\circ}\text{C}$ in Lysogeny broth (LB) medium containing 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol, induced at $A_{600} = 0.8$ by the addition of 0.02% (w/v) L-arabinose and grown for 2 h before centrifugation. The cell pellet was resuspended in Tris-HCl 20 mM pH 8.0. Cells were broken by a French pressure cell at 69 MPa (*i.e.* 10 000 psi) and then centrifuged twice at 8500g to remove the inclusion bodies and unbroken cells. The soluble fraction was applied on a sucrose step gradient (0.5 and 1.5 M) and then centrifuged for 3 h at 200 000g, 4 $^{\circ}\text{C}$. The pellet, corresponding to the outer membrane fraction, was resuspended in a solution containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol (v/v), 2% βOG (w/v) (Anatrace), then stirred overnight at 23 $^{\circ}\text{C}$. The solubilized membrane proteins were recovered by centrifugation for 30 min at 50 000g and further loaded onto a Ni-NTA resin column pre-equilibrated in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol (v/v), and 0.9% βOG (w/v). The column was washed with the same buffer plus 10 mM imidazole. The protein was eluted by a linear gradient of imidazole (10 to 400 mM).

The fractions containing the OprM protein, eluted between 100 and 250 mM imidazole, were concentrated up to 5 mg mL^{-1} by a 30 kDa cutoff Amicon system (Millipore) and its buffer changed for the following storage solution: 50 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl, 10% glycerol and 0.9% detergent pH 7.5.

2.4. Lipid bilayer formation

Firstly, 38 μL of buffer solution was introduced in the upper chamber, and 8 μL of lipid solution followed by 38 μL of buffer solution was flowed into the bottom channel. A layer of lipid membrane formed over the aperture in the parylene film.^{12,17,18} Then, the two electrodes were inserted respectively in the

chamber and fluidic channel inlet (Fig. 2). 2 μL of 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OprM solution was then added into the upper recording chamber, leading to a final protein concentration of 1.5 nM.

2.5. Optical and electrical monitoring

The above-mentioned procedure was performed on an inverted optical microscopy stage (ECLIPSE Ti-S, NIKON, Japan) covered by a Faraday cage to protect it from ambient noise. Formation of the BLM was optically monitored from the bottom of the chip with a transmitted light. The membrane current was measured using a patch-clamp amplifier (Axon Axopatch 200B, Molecular Devices, USA) connected to a couple of Ag/AgCl electrodes; one electrode was inserted in the upper recording chamber (*CIS* side, recording electrode), the other was inserted into the bottom channel (*TRANS* side, counter/reference electrode). The amplifier was connected with a digital data acquisition system (Digidata 1440A and Axopatch 200B, Molecular Devices, U.S.A.).

3. Results and discussion

3.1. Optical and electrical monitoring of the bilayer lipid membrane (BLM)

The BLM is formed in the chamber, over the 45 μm sized aperture micromachined in the parylene film. After the microfluidic procedure, the circular border separating the BLM (Fig. 3, central circle) and a supporting annulus (the Plateau-Gibbs border,^{19,20} consisting of lipid solution contained between two phospholipids monolayers) appeared spontaneously within 10 min in the aperture. Using this method, the BLM can be achieved easily with a success rate higher than 90% (calculated from more than 220 experiments out of 50 chips). As reported before, this Plateau-Gibbs border was no longer visible if the aperture in the parylene partition becomes smaller than 45 μm , which is probably due to the optical diffraction.¹² BLM formation was visualized through phase contrast microscopy. As shown in Fig. 3 the size of the reconstructed BLM depends directly on the applied voltage between *CIS* and *TRANS* sides. The electric capacitance of the BLM was measured by applying square signals across the membrane using a built-in function of Clamplex V10.2 software. A rapid increase in electric capacitance was observed upon the BLM formation, and the specific capacitance (C_s , capacitance over the total area of the BLM) reached 0.58 $\mu\text{F cm}^{-2}$. This value is higher than the C_s of BLM formed with *n*-decane reported in the literature ($\sim 0.4 \mu\text{F cm}^{-2}$) because a mixture solvent of 1-Hexanol (80%) and *n*-Decane (20%) was used to achieve the BLM.²⁰ This phenomenon is consistent with previous observations.¹⁴ We compensated the evaporation by adding some buffer to the chamber and channel thanks to the access to both sides of the BLM within the device.

3.2. Electrical recording of OprM reconstituted in the membrane

The OprM protein solution was added from either the channel or chamber side. Both cases permitted successful OprM insertion and activity monitoring. The electric potential is always given at the *CIS* side with respect to the *TRANS* side. This electrical

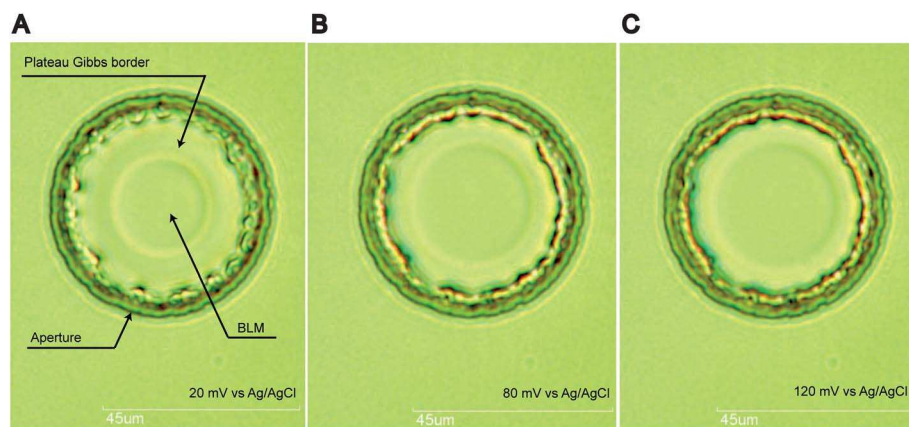


Fig. 3 The typical bilayer lipid membrane (BLM) reconstituted in the parylene aperture. The 45 μm diameter aperture in the parylene film (dark circle) contains the BLM (central circle) which is supported by the thick lipid plateau-Gibbs border. The voltage applied between both sides of the BLM affects its size: the BLM diameter increases from 20 μm (A) to 40 μm (C) while the transmembrane voltage increases from 20 mV to 120 mV. This dependence is explained by static charges stored between both sides of the membrane ($Q = CV$, where C is the capacitance of the BLM and V is the applied voltage) which attract each other, and repels the solvent towards the border of the aperture in the parylene film. Lipid solution: 25 mg mL^{-1} DPhPC in mixture solvent (80% 1-Hexanol and 20% *n*-Decane, v/v), buffer: 50 mM KCl + 100 mM NaCl + 0.45% (w/v) βOG , pH = 7.5.

potential must be negative for OprM insertion from the micro-channel, or positive if OprM is injected in the microchamber. The insertion events appear several minutes after OprM injection, once the BLM and fluids in the microchannel are stable (typically at $t = 5$ min). During this stabilization process, the clamp voltage was progressively increased and the conductance of the membrane was monitored. Single ion channel insertion and activities were recorded.

Case of OprM injected in the micro-channel. 38 μL of 1.5 nM OprM solution was flowed in the channel, and negative potential was applied in the chamber. The ion channel was reconstituted into the BLM, which was accompanied by a fast increase of conductance (Fig. 4, $G_i = 1250$ pS).

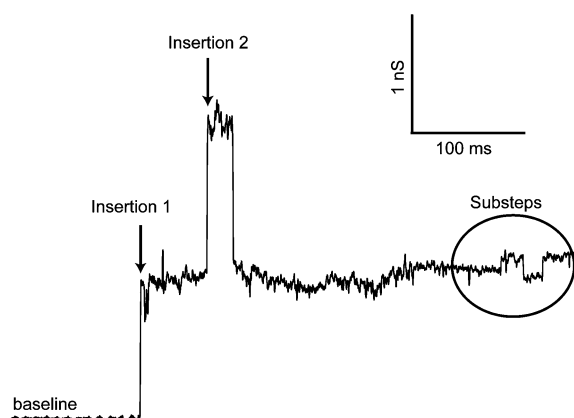


Fig. 4 Channel side insertion. Electrical monitoring of OprM insertion and its activity. OprM was loaded from the micro-channel. A fast rise of conductance $G_i = 1250$ pS occurs during the insertion event at an applied voltage -120 mV. Buffer: 50 mM sodium phosphate + 100 mM sodium chloride + 0.45% (w/v) βOG , pH = 7.5, Lipid: 25 mg mL^{-1} DPhPC in mixture solvent (80% 1-Hexanol and 20% *n*-Decane, v/v). Recording conditions: filter low pass 10 kHz, sampling 50 kHz. Boxcar smoothing, 27 points.

Case of OprM injected in the micro-chamber. When OprM was added from the chamber side, 2 μL of 30 nM OprM was injected into the buffer from the chamber after the BLM was formed and stable. A positive potential was applied in the chamber. Ion channels were also recorded in this case characterized by a fast increase of the conductance (Fig. 5, $G_i = 1250$ pS).

Hence, it appears that the conductance steps are similar when the protein is inserted from either side of the bilayer (Fig. 4 and 5). Note that inserting from the chamber side appears to be more relevant because it makes it possible to add the protein several times, as its activity declined with time, without perturbing the stability of the BLM. The activity of OprM depends mainly on the preparation process, the storage and unfreezing conditions. According to our experimental observations, the

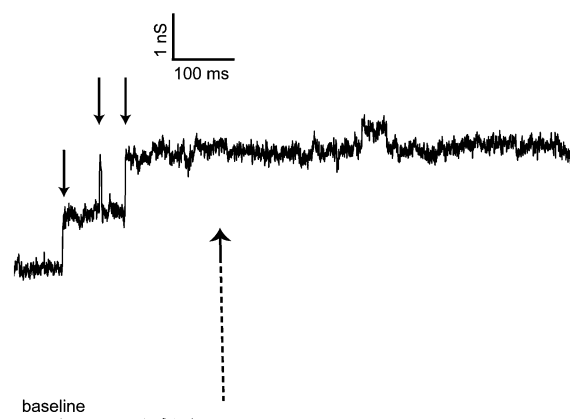


Fig. 5 Chamber side insertion. Electrical monitoring of OprM insertions (each insertion event is indicated with a solid line arrow). Fast rise of conductance $G_i = 1250$ pS occurs for each insertion event at an applied voltage of 50 mV. Buffer: 50 mM sodium phosphate + 100 mM sodium chloride + 0.45% (w/v) βOG , pH = 7.5, Lipid: 50 mg mL^{-1} PC in *n*-Decane). Recording conditions: filter low pass 2 kHz, sampling 10 kHz. Boxcar smoothing, 5 points.

OprM activity declines after 30–60 min once inserted, and the BLM can be stable for more than 1 h of electrical recording.

Fig. 4 and 5 (corresponding respectively to channel and chamber insertion) show the typical step-like increases in transmembrane current that characterize the successive single OprM channel insertions, with 1250 ± 13 pS (mean \pm standard error calculated on 200 events) increase in conductance for each single insertion (see the solid line arrows). The measured single channel conductance of OprM stays comparable over 200 insertion events (1250 ± 13 pS), which indicates the successful and reproducible insertion of native OprM.

3.3. Influence of the buffer composition on conductance

As reported, the OprM channel is cation selective.²¹ New experiments were designed to study the effects of buffer composition on conductance by monitoring the conductance of OprM in 150 mM K⁺ medium instead of 150 mM Na⁺ medium. The results show a significant decrease in single OprM channel conductance from 1250 ± 13 pS in the presence of 150 mM Na⁺ to 380 ± 5 pS in the presence of 150 mM K⁺. When increasing the concentration of K⁺ from 150 mM to 1 M, the conductance increased from 380 ± 5 pS to 726 ± 36 pS. The use of K⁺ instead of Na⁺ strongly decreases the conductance of a single OprM channel.

These measurements are consistent with the OprM conductance reported (850 pS, *versus* 726 pS in our case with 1 M KCl buffer).²¹

3.4. Comparison with other porins

Those values are also comparable with conductance measurements performed with other channel proteins. Experiments reported with OmpF,²² a trimeric influx porin, in 150 mM KCl gave a conductance of 940 pS for the all-open state trimer leading to ~ 310 pS for one monomer, to be compared with the 380 pS we measured for OprM in similar conditions.

Published values for TolC,²³ presenting similar inner and outer diameters, indicate 80 pS conductance for a single channel that is much lower than in our case. Nevertheless those experiments were performed in different experimental conditions (1 mM Hepes pH 7.5, 1 M KCl), making the comparison difficult.

3.5. Effect of electric field orientation on OprM insertion

Interestingly, we found that reversing the polarity of the applied potential tends to inhibit protein insertions, and leads to the progressive expel of inserted proteins out of the BLM. This shows that a positive voltage is necessary to maintain the ion channel inserted from the chamber within the BLM. It can be explained by the structure of OprM. As we know, OprM inserts into the BLM with its β -barrel, which only represents a small part (less than one third length) of the protein. In order to achieve a successful and stable insertion, an electric field with a defined direction is needed. This phenomenon has not been reported elsewhere, nevertheless, in the case of TolC,²³ it was mentioned that the conductance noise was more prominent at high negative potentials than at positive ones. This could reflect the more difficult ion crossing in the non-natural direction or/and different repartitions of charges inside the channel.

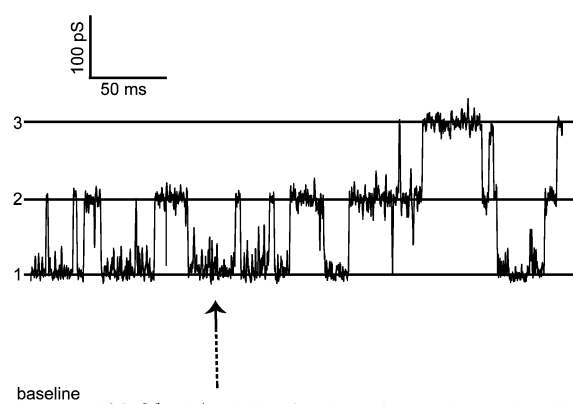


Fig. 6 Ion channel activity of OprM recorded within the microfluidic chip. Three sub-states of conductance are indicated. The BLM is composed of 25 mg mL⁻¹ DPhPC in 50% 1-Hexanol + 50% *n*-Decane (v/v). Applied voltage 120 mV, sub-steps' conductance $G_i = 125$ pS. Recording conditions: low pass filter 10 kHz, sampling 50 kHz. Boxcar smoothing, 27 points.

3.6. Protein activity and conductance sublevels

After the equilibration period, we clearly found that sub-states (identified by distinct conductance sublevels) can be recorded once OprM becomes active within the BLM (Fig. 6). These sub-states last for few milliseconds up to hundred of milliseconds, and could be recorded during a long period (typically 20 min). According to our observations these sub-states indicated at least five distinct levels (three levels are shown on Fig. 6) that might correspond to the different possible structural conformations of the helix bundles “controlling” the opening of the pore. The oscillation of the protein between those different conformations leads to regular step variations of the conductance (125 pS) after the insertion event.

4. Conclusions

This paper shows the feasibility of using a microfluidic device, incorporated with a miniaturized artificial BLM, for monitoring the insertion and electrical activity of the OprM protein. This biomimetic device is able to define very stable and optimized conditions. As a result, both the insertion and activity of OprM could be monitored during the same recording for the first time. In this work, the transmembrane voltage necessary for the OprM insertion was investigated, which showed the importance of the electric field direction. Furthermore, the single channel conductance of OprM has been characterized. It was clearly found that the conductance of OprM depended on the nature and concentration of the cations contained in the buffer. The effect of sodium and potassium ions on the OprM conductance has been addressed. The single channel conductance of OprM in sodium medium is 3 times higher than that in potassium medium, which indicated the sodium ion selectivity of OprM. During the electrical monitoring of OprM, high-dynamic sub-step activities of OprM were recorded for the first time, which characterized oscillation of the protein between various sublevels, probably corresponding to different arrangements of bundles controlling the conductance of the pore. This work provides an analysis

method in membrane protein investigation and it shows a wide range of potential applications in pharmacology and biochemistry.

Acknowledgements

This work was financially supported by le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), L'Agence Nationale de la Recherche ANR-PNano and Japan Science and Technology Agency (JST). L. M. was supported by a grant from Vaincre la Mucoviscidose.

References

- 1 T. Strateva and D. Yordanov, *J. Med. Microbiol.*, 2009, **58**, 1133–1148.
- 2 T. Schirmer, *J. Struct. Biol.*, 1998, **121**, 101–109.
- 3 R. Koebnik, K. P. Locher and P. Van Gelder, *Mol. Microbiol.*, 2000, **37**, 239–253.
- 4 H. Nikaido, *Science*, 1994, **264**, 382–388.
- 5 H. Akama, M. Kanemaki, M. Yoshimura, T. Tsukihara, T. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. Narita, A. Nakagawa and T. J. Nakae, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 52816–52819.
- 6 G. Phan, H. Benabdelhak, M. B. Lascombe, P. Benas, S. Rety, M. Picard, A. Ducruix, C. Etchebest and I. Broutin, *Structure*, 2010, **18**, 507–517.
- 7 V. Koronakis, *FEBS Lett.*, 2003, **555**, 66–71.
- 8 W. F. Wonderlin, A. Finkel and R. J. French, *Biophys. J.*, 1990, **58**, 289–297.
- 9 N. Fertig, C. Meyer, R. H. Blick, C. Trautmann and J. C. Behrends, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2001, **64**, 040901.
- 10 B. Zhang, J. Galusha, P. G. Shiozawa, G. Wang, A. J. Bergren, R. M. Jones, R. J. White, E. N. Ervin, C. C. Cauley and H. S. White, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 4778–4787.
- 11 T. Ide, T. Kobayashi and M. Hirano, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 7792–7795.
- 12 B. Le Pioufle, H. Suzuki, K. Tabata, H. Noji and S. Takeuchi, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 328–332.
- 13 M. Kitta, H. Tanaka and T. Kawai, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 931–934.
- 14 T. Osaki, H. Suzuki, B. Le Pioufle and S. Takeuchi, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 9866–9870.
- 15 N. Fertig, M. George, M. Klau, C. Meyer, A. Tilke, C. Sobotta, R. H. Blick and J. C. Behrends, *Recept. Channels*, 2003, **9**, 29–40.
- 16 R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki and S. Takeuchi, *Small*, 2010, **6**, 2100–2104.
- 17 H. Suzuki, K. Tabata, Y. Kato-Yamada, H. Noji and S. Takeuchi, *Lab Chip*, 2004, **4**, 502–505.
- 18 H. Suzuki, K. V. Tabata, H. Noji and S. Takeuchi, *Langmuir*, 2006, **22**, 1937–1942.
- 19 H. S. White, in *Ion Channels Reconstitution*, ed. C. Miller, Plenum Press, New York, 1986, pp. 3–32.
- 20 H. Fujiwara, M. Fujihara and T. Ishiwata, *J. Chem. Phys.*, 2003, **119**, 6768–6775.
- 21 K. K. Y. Wong, F. S. L. Brinkman, R. S. Benz and R. E. W. Hancock, *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 367–374.
- 22 A. Baslé, R. Iyer and A. H. Delcour, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2004, **1664**, 100–107.
- 23 C. Andersen, C. Hughes and V. Koronakis, *J. Membr. Biol.*, 2002, **185**, 83–92.

3. Caractérisation de mutants de l'ouverture périplasmique d'OprM par complémentation

Afin de comprendre comment s'effectue le mécanisme d'ouverture d'OprM nécessaire à l'efflux des antibiotiques, nous avons décidé de construire plusieurs mutants de la porine OprM. Les résidus que nous avons choisis de muter sont impliqués dans des liaisons maintenant l'extrémité périplasmique dans une conformation fermée. En effet, chaque monomère comporte à ce niveau un pont salin entre les hélices H7 et H8 faisant intervenir les résidus R403 et D409 et une liaison hydrogène entre les résidus D205 et Y404 qui maintient les hélices H4 et H7. De plus, il existe un pont salin reliant deux monomères voisins grâce aux résidus D416 et R419. Sept mutants ont été créés : quatre mutants simples (R403L, Y404F, D416A, R419A), deux mutants doubles (R403L-Y404F et D416A-R419A) et enfin un quadruple mutant (R403L-Y404F-D416A-R419A). Nous espérons ainsi déterminer l'importance de chacune de ces liaisons dans le passage d'un état fermé à un état ouvert et caractériser l'effet de chaque acide aminé sur le niveau d'ouverture d'OprM. Pour évaluer l'effet de ces mutants, nous avons étudié leur capacité à compléter une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, délétée de la version chromosomique du gène *oprM*, vis à vis de la résistance aux antibiotiques. Cette souche, dénommée par la suite PAO1 Δ OprM, a été construite par Sophie Guénard, doctorante au laboratoire de Bactériologie de la faculté de médecine de Besançon, où nous avons été initiés par Catherine Llanes aux expériences de complémentation avant de les mettre en place au sein de notre laboratoire.

3.1. Antibiogrammes

Pour chaque mutant nous avons dans un premier temps évalué de façon qualitative sa résistance aux antibiotiques en réalisant des antibiogrammes. Cette technique permet en effet de tester la résistance d'une souche vis-à-vis de plusieurs antibiotiques simultanément (16 dans le dispositif expérimental utilisé) et de comparer son niveau de résistance à celle de la souche sauvage témoin PAO1 (PAO1wt) en mesurant les diamètres d'inhibition autour de chaque disque d'antibiotiques. La répartition des 16 antibiotiques est indiquée dans la figure 71.

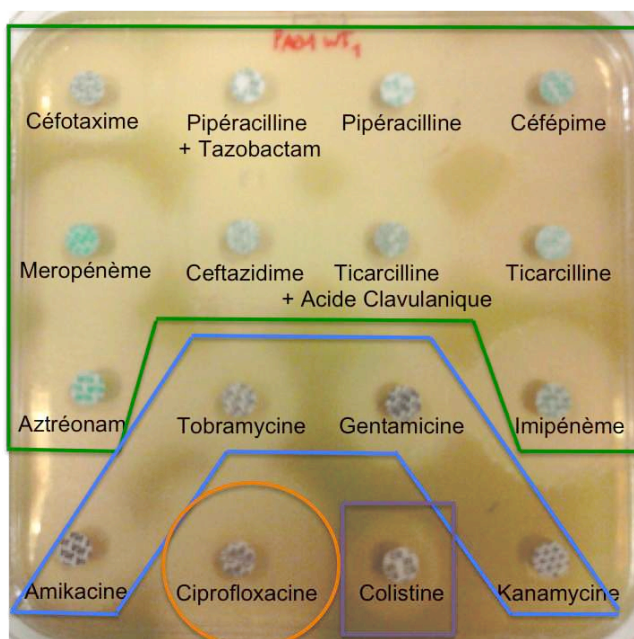


Fig. 71 : Disposition des antibiotiques pour la réalisation des antibiogrammes

10 β -lactamines, de générations différentes sont utilisées (encadrées en vert), ainsi que 4 aminoglycosides (encadrés en bleu), une fluoroquinolone, la ciprofloxacin (encerclée en orange) et la colistine encadrée en violet.

Une photographie des antibiogrammes de chaque mutant et des souches contrôles est présentée dans la figure 72 et les mesures des diamètres d'inhibition sont indiquées dans la figure 73. Les diamètres mesurés ne sont donnés qu'à titre indicatif car on peut observer que très souvent les disques d'inhibition sont jointifs et la mesure se révèle alors assez approximative. C'est pourquoi cette technique n'est utilisée ici que de manière qualitative, en jugeant notamment de l'espace de croissance entre les disques, reflétant un niveau de résistance plus ou moins important comparé aux souches contrôles. Ainsi l'analyse des photographies montre que la délétion d'OprM (souche PAO1 Δ OprM) (Fig. 72B) génère, comme attendu, une sensibilité très forte aux antibiotiques par rapport à la souche sauvage (PAO1wt) (Fig. 72A). Ceci se traduit visuellement par le fait que presque tous les disques sont jointifs à l'exception de celui autour de la kanamycine, antibiotique pour lequel *Pseudomonas aeruginosa* possède une résistance naturelle et de celui autour de l'imipénème, antibiotique qui n'est pas un substrat de la pompe MexAB-OprM. Cette sensibilité accrue aux antibiotiques est inversée dès lors que l'on complémente la souche avec une version plasmidique du gène sauvage d'*oprM* (souche PAO1 Δ OprM + pME6001-OprMwt) (Fig. 72C). Le vecteur seul (souche PAO1 Δ OprM + pME6001) présente un profil identique à celui de la souche PAO1 Δ OprM hormis la résistance à la gentamicine, marqueur de sélection de ce plasmide (Fig. 72D). En ce qui concerne les simples et doubles mutants, contrairement à nos premières attentes, aucun d'entre eux ne s'est avéré être plus résistant que la souche PAO1wt (Fig. 72E à J). En revanche on peut observer des niveaux intermédiaires de résistance par rapport aux souches contrôles qui diffèrent selon les acides aminés mutés. Ainsi, en observant l'espace libre entre les disques d'inhibition autour des β -lactamines (2 premières rangées), on peut d'ores et déjà établir un premier classement des mutants selon leur résistance croissante : le mutant Y404F est le plus sensible de tous, les mutants D416A et R403L-Y404F ont des niveaux de résistance moyens alors que les mutants R403L, R419A et D416A-R419A semblent quasiment aussi résistants qu'OprM sauvage. Le quadruple mutant D416A-R419A-R403L-Y404F a, quant à lui, un profil relativement différent des autres mutants puisqu'il semble être relativement bien résistant aux β -lactamines, (le disque autour

Partie III – Résultats & Discussion

Chapitre III – Caractérisation de mutants de l'ouverture périplasmique d'OprM par complémentation

de la ciprofloxacine semble un peu plus arrondi) mais ce mutant est surtout hyper-résistant aux aminoglycosides (Fig. 72K).



A/ Souche PA01wt



C/ PA01 Δ OprM +
pME6001-OprMwt



B/ Souche PA01 Δ OprM



D/ PA01 Δ OprM +
pME6001



E/ PA01ΔOprM +
pME6001-OprM R403L



G/ PA01ΔOprM +
pME6001-OprM Y404F



F/ PA01ΔOprM +
pME6001-OprM D416A



H/ PA01ΔOprM +
pME6001-OprM R419A



I/ PA01ΔOprM +
pME6001-OprM
R403L-Y404F



K/ PA01ΔOprM +
pME6001-OprM
R403L-Y404F-
D416A-R419A
(Quad.Mut.)



J/ PA01ΔOprM +
pME6001-OprM
D416A-R419A

Fig. 72 : Antibiogrammes des différents mutants d'OprM

	CTX	TZP	PIP	FEP	MEM	CAZ	TCC	TIC	ATM	TM	GM	IMP	AN	CIP	CS	K
PA01WT	23	32	31	28	29	29	27	28	31	24	23	29	24	35, carrée	19	9
PA01ΔOprM	>35	>35	>35	>35	>35	>35	>35	>35	>35	>35	>35	29	>35	>35, carrée	21	11
Δ + pME6001	>35	>35	>35	>35	>35	>35	>35	>35	>35	22	R	29	>35	37, carrée	21	11
Δ + OprMwt	24	33	30	30	30	30	29	28	33	18	R	30	25	36, carrée	20	11
Δ + OprM R403L	25	32	30	30	32	30	29	28	33	19	R	30	24	35, carrée	21	11
Δ + OprM Y404F	28	>35	>35	>35	33	>35	>35	>35	>35	23	R	30	>35	>35	21	11
Δ + OprM D416A	25	30	30	30	29	30	28	28	32	18	R	30	25	35, carrée	21	11
Δ + OprM R419A	25	32	32	28	31	30	30	29	33	19	R	30	25	35, carrée	19	11
Δ + OprM R403L-Y404F	24	>35	>35	>35	29	29	28	28	31	19	R	28	25	35, carrée	22	11
Δ + OprM D416A-R419A	25	>35	33	32	32	29	29	29	33	19	R	30	27	37, carrée	22	11
Δ + OprM Quad. Mut.	24	33	32	30	28	31	29	29	30	R (8)	R	33	19	39	20	R (7)

Fig. 73 : Mesure des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiogrammes

3.2. CMI

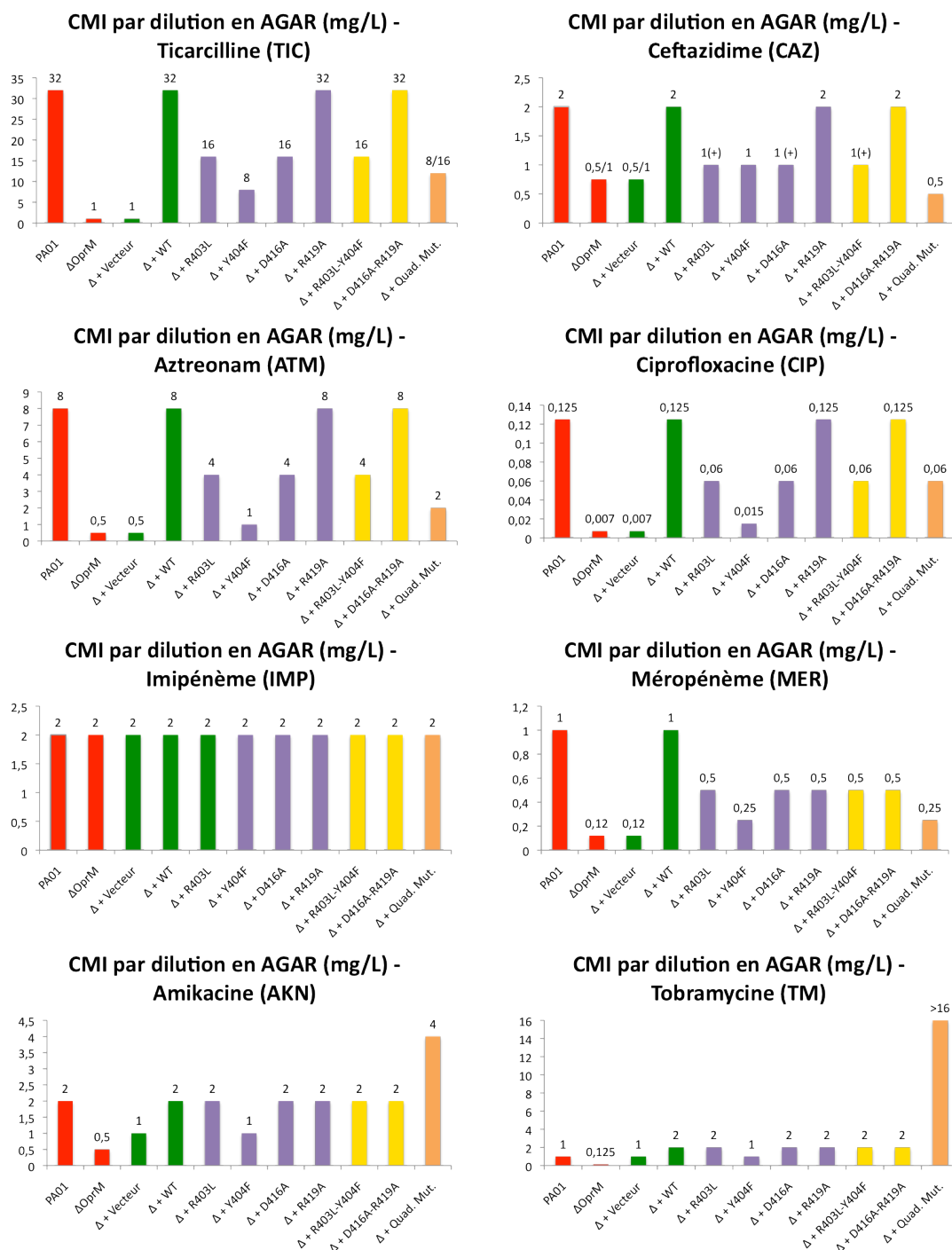
Afin de déterminer de manière plus précise le niveau de résistance des différents mutants, notre deuxième approche a été de réaliser des mesures de CMI (concentration minimale inhibitrice) en milieu gélosé par la méthode de dilution en agar. Nous avons pour cela sélectionné 8 antibiotiques parmi les 16 testés dans le paragraphe précédent en prenant soin de choisir au moins un représentant de chaque classe ou sous classe d'antibiotiques :

- Ticarcilline : pénicilline (β -lactamine)
- Ceftazidime : céphalosporine de 3^{ème} génération (β -lactamine)
- Aztréonam : monobactame (β -lactamine)
- Meropénème : carbapénème (β -lactamine), substrat de la pompe MexAB-OprM
- Imipénème : carbapénème (β -lactamine), non substrat de la pompe MexAB-OprM
- Ciprofloxacine : fluoroquinolone
- Tobramycine : aminoglycoside
- Amikacine : aminoglycoside

Les résultats présentés dans la figure 74 confirment les observations faites avec les antibiogrammes. La souche PA01ΔOprM présente une sensibilité au moins 4

fois supérieure à celle de la souche PAO1wt pour tous les antibiotiques testés et cette sensibilité est même 32 fois supérieure pour la ticarcilline. Les expériences contrôles montrent que la complémentation par le plasmide pME6001-OprMwt permet de restaurer la sensibilité de la souche délétée au même niveau que la souche sauvage. De plus, ces mesures indiquent que le vecteur pME6001 ne génère pas de résistance à lui seul à l'exception des aminoglycosides pour lesquels on observe une amélioration de la résistance d'un facteur 2 par rapport à la souche PAO1 Δ OprM seule. Cet effet mineur peut s'expliquer par la présence sur le vecteur du gène de résistance à la gentamicine, un autre aminoglycoside, qui pourrait induire une résistance très modérée à l'ensemble de cette famille d'antibiotiques. Comme attendu, le test réalisé avec l'imipénème, non substrat de la pompe MexAB-OprM, ne présente aucune différence entre les souches. Quant aux mutants, à présent, on constate que les mutants R419A et D416A-R419A complémentent très efficacement la souche PAO1 Δ OprM puisqu'ils induisent une résistance quasi identique à celle obtenue avec OprM sauvage. Les mutants R403L, D416A et R403L-Y404F génèrent quant à eux une résistance deux fois moins importante que la protéine sauvage mais cette résistance reste significativement supérieure à celle de la souche PAO1 Δ OprM non complémentée (facteur 2 à 16). En revanche le mutant Y404F est plus sensible que les autres mutants puisqu'il ne permet d'augmenter au mieux que d'un facteur 2 la résistance de la souche PAO1 Δ OprM. Cet acide aminé semble donc jouer un rôle clé soit au niveau de la protéine elle-même, soit dans son interaction avec ses partenaires. Enfin, on peut remarquer que les niveaux de résistance des mutants sont moins marqués pour les aminoglycosides que pour les autres antibiotiques. En effet, seul le mutant Y404F garde une sensibilité à cette famille d'antibiotiques alors que les autres mutants restaurent une résistance comparable à celle obtenue avec OprMwt. Cette particularité pourrait s'expliquer par le fait que les aminosides ne sont pas pris en charge par la pompe MexAB-OprM mais par la pompe MexXY qui fonctionne également avec OprM. Il est possible dans ce cas, que les résidus

d'OprM impliqués avec les partenaires de la membrane interne ne soient pas les mêmes pour les deux systèmes et que la pompe MexXY présente une plus grande flexibilité d'adaptation à ces différents résidus modifiés. Le quadruple mutant (R403L-Y404F-D416A-R419A) réagit quant à lui de manière très différente des autres mutants : en effet, bien qu'il restaure une partie de la résistance aux beta-lactamines (ticarcilline, ciprofloxacine, aztréonam), il s'avère bien moins efficace que la forme sauvage d'OprM pour ces antibiotiques. En revanche, il est très efficace pour l'efflux des aminoglycosides puisqu'on obtient une CMI deux fois supérieure pour l'amikacine et même 8 fois supérieure pour la tobramycine. Cette hyper-résistance préférentielle vis à vis des aminoglycosides suggère que ce mutant fonctionnerait mieux ou davantage avec le système MexXY qu'avec le système MexAB.

**Fig. 74 : Détermination de la CMI des mutants d'OprM pour 8 antibiotiques**

La CMI des mutants d'OprM vis-à-vis de 8 antibiotiques a été déterminée par la méthode de dilution en agar. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes regroupés par antibiotique. Les souches PAO1wt et PAO1ΔOprM sont représentées en rouge, la souche PAO1ΔOprM complémentée avec le vecteur pME6001 seul ou contenant OprMwt est représentée en vert. Les mutants simples, mutants doubles et le quadruple mutant sont matérialisés en violet, jaune et orange respectivement.

3.3. Localisation membranaire

Nous avons vérifié la présence des différents mutants dans la membrane externe de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Δ OprM afin de nous assurer que les différences de résistance n'étaient pas dues à une mauvaise localisation de la protéine. Pour cela, nous avons réalisé des cultures de 200 mL puis extrait la fraction de la membrane externe afin de détecter la présence de la protéine par Western Blot grâce à des anticorps anti-histidine. Comme l'indique la figure 75, les protéines mutantes sont bien présentes dans la membrane externe. Toutefois, il semblerait que la protéine OprM-Y404F n'y soit présente qu'en très faible quantité (piste 4). Afin de s'assurer qu'elle n'est pas retenue de manière prolongée dans la membrane interne suite à un défaut d'adressage, nous avons également analysé cette fraction membranaire et une fois de plus cette version mutante y est présente en quantité moindre que les autres versions d'OprM. Il semble donc que cette forme soit plus faiblement exprimée que les autres ou partiellement dégradée de manière rapide. De plus, nous avons pu noter que le quadruple mutant semble très efficacement adressé à la membrane externe, car, contrairement aux autres mutants, il est pratiquement absent des extraits de membrane interne.

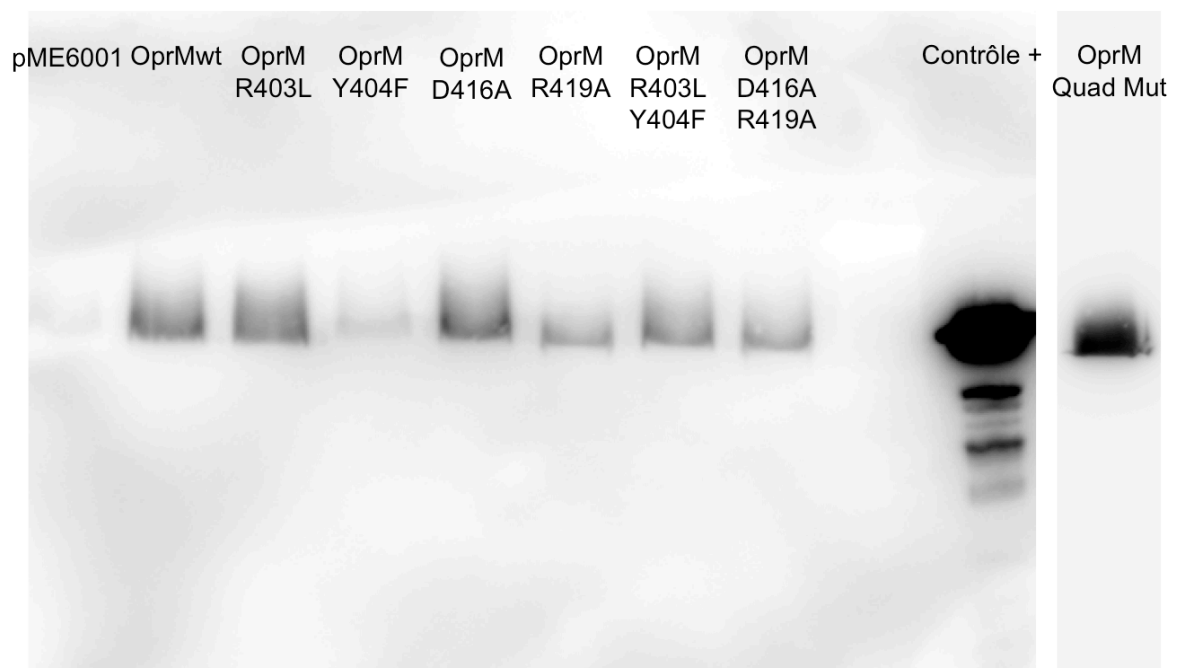


Fig. 75 : Western Blot réalisé sur des extraits de membrane externe à partir de cultures de différents mutants d'OprM

Après solubilisation préférentielle de la membrane interne par le N-Lauryl-Sarcosyl, la fraction de membrane externe isolée est déposée sur gel SDS-Page puis transférée sur une membrane PVDF et la présence des formes sauvages ou mutantes d'OprM est détectée par un anticorps anti-His. Un aliquot d'OprM purifié est déposé sur une piste comme contrôle positif. Un contrôle négatif est également déposé à partir d'une culture du vecteur pME6001 ne contenant pas d'insert.

3.4. Interaction avec MexA par BN-PAGE

Nous avons souhaité vérifier si les différents niveaux de résistance des mutants et notamment la faible résistance du mutant Y404F ne pouvaient pas s'expliquer par une perte d'interaction avec MexA. Pour cela, nous avons réalisé des gels BN-PAGE comme ceux présentés dans le chapitre I pour la version sauvage d'OprM. Nous avons choisi d'étudier 4 mutants : 2 mutants simples (OprM D416A et OprM Y404F) et 2 mutants doubles (OprM R403L-Y404F) et (OprM D416A-R419A) que nous avons purifiés de manière similaire à la version sauvage de la protéine. La figure 74 montre que les mutants d'OprM forment toujours des trimères (pistes A3, A4, B5 et B6) et que malgré les mutations d'acides aminés localisés dans l'extrémité périplasmique d'OprM, ils conservent leur capacité à interagir avec MexA (pistes A5,

A6, B3 et B4). Ces résultats sont toutefois compatibles avec les observations faites sur les mutants équivalents de TolC pour lesquels la résolution de la structure cristallographique a montré l'apparition d'une crevasse plus importante que dans la forme sauvage de la porine qui correspondrait à la zone d'interaction de la protéine MFP (Bavro, Pietras *et al.* 2008; Pei, Hinchliffe *et al.* 2011). Nous serons donc amenés à vérifier la présence d'une telle poche d'interaction sur les mutants d'OprM étudiés par la résolution de leurs structures cristallographiques.

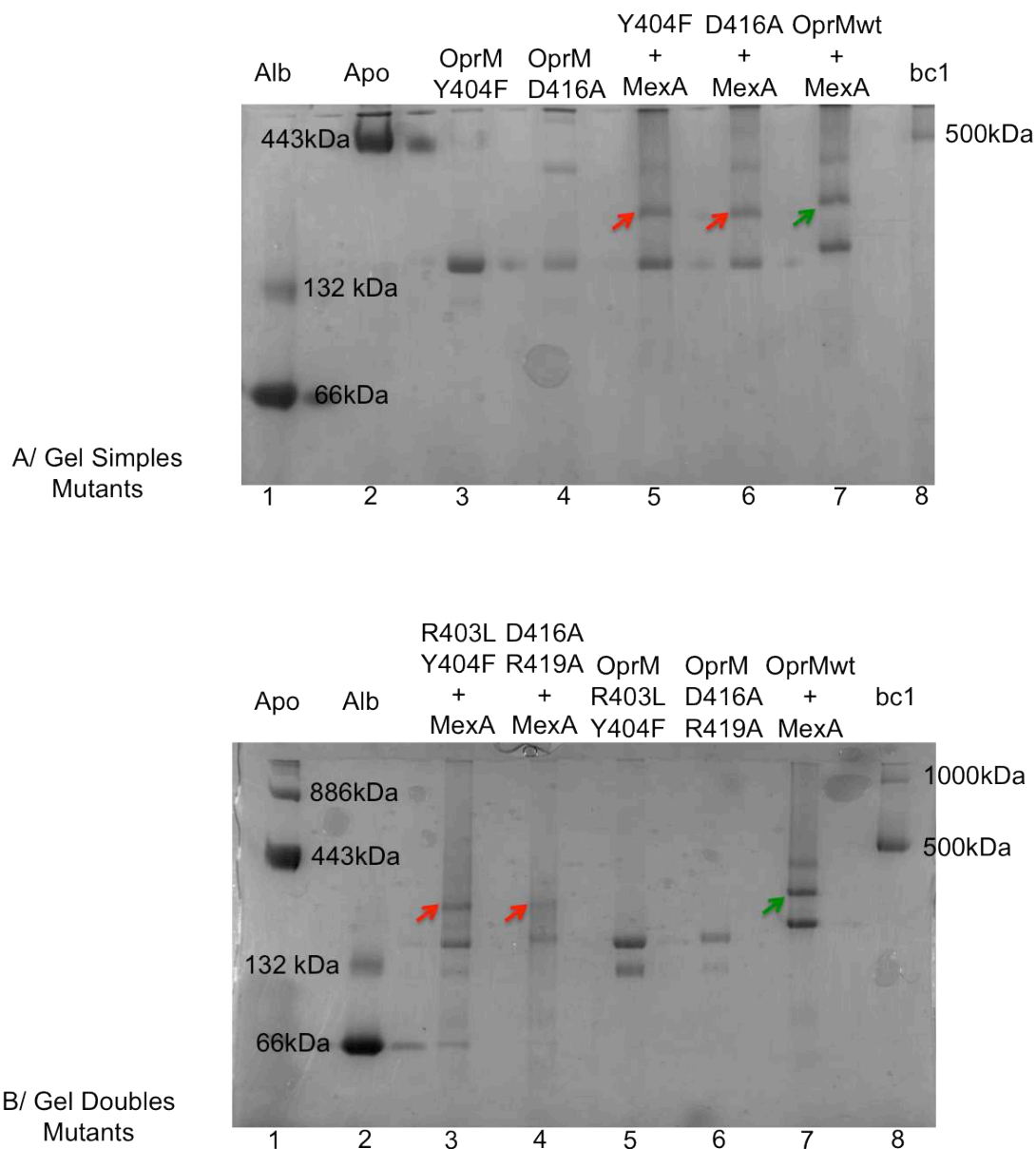


Fig. 76 : Mise en évidence de l'interaction des mutants d'OprM avec MexA par BN-PAGE

L'interaction de deux simples mutants d'OprM (Y404F et D416A) (A/) ou de deux doubles mutants (R403L-Y404F et D416A-R419A) (B/) a été testée sur gel bleu natif. Les complexes bipartites formés sont indiqués par des flèches rouges dans le cas des mutants d'OprM et vertes pour OprMwt utilisé comme contrôle positif. Des protéines témoins ont été utilisées comme marqueur de masse (pistes 1B et 2A : Apoferritine, pistes 1A et 2B : Albumine, pistes 8A et 8B cytochrome bc1).

3.5. Etude de l'influx à travers OprM

N'ayant obtenu aucun mutant hyper-résistant vis-à-vis de l'ensemble des antibiotiques par rapport à la forme sauvage d'OprM, l'hypothèse de l'existence d'une diffusion passive des antibiotiques à travers les mutants d'OprM qui contrebalancerait une partie de l'efflux, devait être posée. Pour tester cette hypothèse nous avons donc cherché un moyen de n'étudier que ce phénomène d'influx à travers OprM. Cette étude se voulait être également une première approche permettant d'évaluer de manière indirecte le niveau d'ouverture de chaque mutant d'OprM.

Une expérience a été conçue en se basant sur les travaux de Bavro, Pietras *et al.* (2008) dans lesquels il a été observé une diffusion passive de la vancomycine au travers d'un mutant d'ouverture de TolC (TolC Y362F-R637E). Cet antibiotique est normalement utilisé uniquement contre les bactéries à Gram positif car il ne peut franchir la membrane externe des bactéries à Gram négatif via les porines classiques du fait de sa taille (1450 Da). Si une souche à Gram négatif exprimant une protéine de type OMF ouverte, devient sensible à cet antibiotique c'est donc qu'il a pénétré dans la bactérie grâce à cette ouverture. Dans notre cas nous avons d'abord utilisé une souche d'*E. coli* délétée de TolC et la souche sauvage correspondante que nous avons transformées avec 4 mutants d'OprM présentant des niveaux différents de résistance aux antibiotiques. OprM n'étant pas fonctionnelle avec AcrA-AcrB (Tikhonova, Wang *et al.* 2002; Stegmeier, Polleichtner *et al.* 2006) et TolC n'étant pas présente, nous nous prémunissons ainsi de tout phénomène éventuel d'efflux ou d'influx via TolC. Nous avons également analysé l'influx de la vancomycine directement dans les souches de *Pseudomonas aeruginosa* afin d'étudier notamment le niveau d'ouverture du quadruple mutant dont le phénotype se distingue des autres mutants.

Les résultats présentés dans la figure 77 montrent que les quatre mutants testés dans les souches *wt* d'*E. coli* ou délétées de TolC, se comportent comme la forme sauvage d'OprM transformée dans ces mêmes souches. Toutefois, on peut noter que la souche *wt* d'*E. coli* présente une CMI plus faible que la souche correspondante délétée de TolC. Ceci indique donc qu'à forte concentration la vancomycine est capable de pénétrer au travers de TolC.

Si l'on s'intéresse à présent aux souches de *Pseudomonas aeruginosa*, on peut remarquer que l'on n'observe plus cet effet lié à la perte de la protéine OMF. En effet, la souche PAO1*wt* et PAO1 Δ OprM possèdent toutes les deux une CMI supérieure à 512 mg/L. Ceci suggère donc que même à forte concentration la vancomycine ne peut pas pénétrer dans la bactérie via OprM. Nous avons donc ici une illustration d'une organisation structurale différente de ces deux protéines OMF de pompes d'efflux d'organismes voisins. Ceci peut s'expliquer notamment par des différences locales observées à partir des structures cristallographiques dans la région du tonneau β . En effet, sur une coupe transversale au niveau de la membrane, OprM présente un tonneau β triangulaire contrairement à TolC pour lequel il est plutôt cylindrique. De plus, les boucles extracellulaires qui ferment la partie supérieure de la porine laissent une ouverture de 6 Å dans le cas de TolC contre 3 Å seulement pour OprM (Phan, Benabdelhak *et al.* 2010). Ces variations peuvent expliquer la différence de comportement de ces deux protéines pourtant voisines lorsqu'elles sont mises en présence d'une forte concentration de vancomycine. Enfin, on peut noter que la CMI pour la vancomycine dans les souches de *Pseudomonas aeruginosa* est supérieure à celle des souches d'*E. coli*, illustrant la présence d'une membrane externe plus imperméable chez le bacille pyocyanique et chez le colibacille.

En ce qui concerne les mutants d'OprM transformés dans la souche PAO1 Δ OprM, seul le quadruple mutant devient sensible à la vancomycine avec une CMI de 128 mg/L contre plus de 256 mg/L pour les autres mutants qui se comportent comme la forme sauvage d'OprM. Nous avons donc ici l'indication probable d'un niveau d'ouverture plus important pour ce mutant d'OprM. Il semblerait donc que seule la rupture des trois liaisons assurant la constriction périplasmique (2 liaisons hydrogène

D205-Y404 et D409-R403 et un pont salin D416-R419) permette d'ouvrir constitutivement la porine OprM.

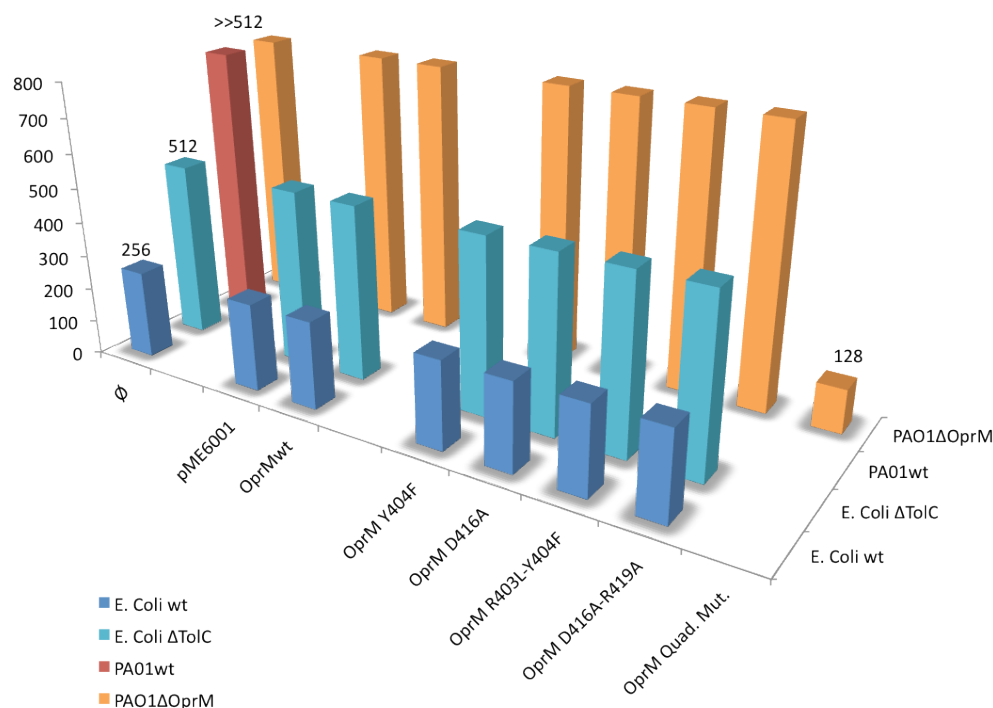


Fig. 77 : Evaluation de l'influx de vancomycine au travers des mutants d'OprM

La CMI pour la vancomycine a été déterminée par la méthode de dilution en milieu agar. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes, colorés en bleu pour la souche d'E. coli sauvage, en cyan pour la souche d'E. coli délétée de TolC, en rouge pour le contrôle de la souche PAO1wt et en orange pour la souche PAO1ΔOprM transformée avec les différents plasmides. Les contrôles de chaque souche non transformée et transformée avec le plasmide pME6001 seul ou contenant OprMwt, sont regroupés sur la gauche de la figure, alors que les mutants d'OprM transformés dans les différentes souches sont concentrés sur la droite.

Ce résultat très prometteur nous incite à poursuivre plus particulièrement l'étude de ce mutant *in vitro*. Dans cet objectif, il sera nécessaire de le cloner dans un vecteur de sur-expression comme cela a déjà été fait pour les autres mutants. Ainsi il sera possible de surproduire la protéine correspondante pour des expériences d'électrophysiologie, des essais de cristallisation etc... En effet, nous avons peut être, au travers de ce mutant, un outil qui nous permettra de décortiquer précisément le mécanisme d'ouverture en diaphragme de la porine OprM.

Toutefois, nous ne pouvons toujours pas à l'heure actuelle expliquer le phénotype si particulier de ce mutant. Plusieurs hypothèses s'offrent à nous et nous serons donc amenés à les vérifier une à une :

- l'hyper-résistance préférentielle vis-à-vis des aminoglycosides de ce quadruple mutant nous fait penser tout d'abord à une sur-expression du système MexXY. On peut envisager que ce mutant d'ouverture d'OprM va être « mobilisé » par la pompe MexXY et ne sera donc plus totalement disponible pour la pompe MexAB, expliquant le niveau de résistance intermédiaire observé dans le paragraphe 3.2 vis à vis des β -lactamines. Toutefois, outre ce phénotype lié aux aminoglycosides, la caractéristique de la sur-expression de cette pompe est une diminution de la CMI pour la ciprofloxacine et le céfépime. Or, dans notre cas, le diamètre observé pour la ciprofloxacine reste largement supérieur à celui d'OprM^{wt} et la CMI obtenue en milieu gélosé n'est pas plus basse que certains autres mutants. N'utilisant pas habituellement de disque de céfépime, il va s'avérer nécessaire d'effectuer ce contrôle pour ce mutant afin de clarifier rapidement le statut de la pompe MexXY. Dans un deuxième temps, nous ferons appel à nos collaborateurs microbiologistes de Besançon, pour une mesure plus précise du niveau d'expression de ce système par RT-PCR quantitative.
- Il est également envisageable que l'hyper-résistance de ce mutant vis à vis des aminoglycosides soit d'origine enzymatique, via le gène de résistance plasmidique. Néanmoins, il est peu probable que ce phénomène ne se produise que pour ce mutant précis et pas pour les autres. Afin d'écarter totalement cette hypothèse, il faudrait de cloner le mutant dans un autre vecteur porteur d'une résistance autre que celle d'un aminoglycoside et compatible avec une utilisation dans les souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

- Une troisième hypothèse serait la survenue malencontreuse d'un événement mutationnel lors de la transformation de la souche PAO1 Δ OprM par ce plasmide. Il pourrait s'agir d'une mutation au niveau de MexXY mais également au niveau ribosomal (cible de cette famille d'antibiotiques) ou une mutation ailleurs? Cette hypothèse étant très vaste, le moyen rapide de s'en affranchir serait de refaire des cellules compétentes, une nouvelle transformation par ce plasmide puis voir si après sélection de quelques clones, tous présentent à nouveau ou non le phénotype observé.

Enfin, on peut toujours simplement envisager que c'est bien la conjugaison seule de ces quatre mutations qui soit à l'origine de ce phénotype grâce à une meilleure affinité d'OprM pour MexXY que la forme sauvage de la porine ou une meilleure affinité vis à vis de cette famille d'antibiotiques. Si les hypothèses précédentes sont écartées, il faudrait alors s'engager dans des mesures d'affinité protéine/protéine ou protéine/antibiotique par des méthodes de Biacore ou d'ITC par exemple.

3.6. Electrophysiologie & Cristallographie

Deux approches nous sont apparues pertinentes pour caractériser *in vitro* le niveau d'ouverture des mutants d'OprM. Il s'agit de l'électrophysiologie et de la cristallisation.

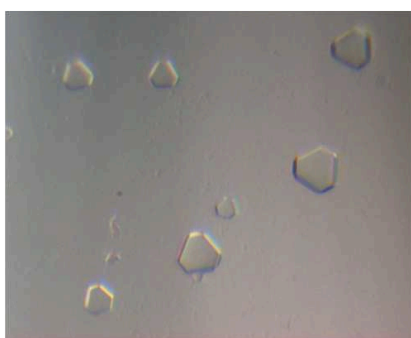
3.6.1. Cristallisation

La cristallisation nous offre la possibilité de mettre en évidence les changements conformationnels induits par chaque mutation et une caractérisation à l'échelle atomique du degré d'ouverture de chaque mutant.

Pour cela, une production importante de chaque protéine est nécessaire afin de pouvoir réaliser des essais de cristallisation. Les mutants OprM Y404F, OprM R403L-Y404F et OprM D416A-R419A, re-clonés dans un vecteur d'expression, ont été produits et purifiés selon la même procédure que la forme sauvage mais

les quantités obtenues à l'heure actuelle restent insuffisantes pour envisager des essais de cristallisation. Il semble donc nécessaire avant tout d'optimiser le protocole de purification de ces mutants.

En revanche différentes pistes de cristallisation ont été obtenues pour le mutant OprM D416A lors d'un premier criblage effectué à l'aide d'un robot de cristallisation en utilisant les kits JCSG I à IV (Qiagen). Les cristaux obtenus présentent principalement une morphologie qui laisse apparaître des sections 2D en forme d'hexagones ou de triangles (Fig. 78A et B). Parmi toutes ces conditions mises en évidence, certaines ont été sélectionnées pour être reproduites et optimisées en boîte Linbro 24 puits et en gouttes suspendues. La condition la plus prometteuse à cette étape est celle issue du kit JCSG III puits F9 (0,1 M MES pH 6, 0,8 M Sulfate d'Ammonium) (Fig. 78C).



A/ Condition JCSG I - B6
0.8 M Sodium dihydrogen phosphate
0.8 M Potassium dihydrogen phosphate
0.1 M HEPES pH 7.5



B/ Condition JCSG II – G6
0.07 M Sodium acetate pH 4.6
5.6 % PEG 4000
30 % Glycerol



C/ Optimisation de la condition JCSG I - B6
0,1M MES pH 6
0,6M Ammonium Sulfate

Fig. 78 : Exemples de pistes de cristallisation du mutant OprM D416A

Le mutant OprM D416A concentré à 5 mg/mL dans du Tris pH8 20 mM, Glycérol 10% (v/v), β -OG 0,9% (w/v) a donné plusieurs pistes de cristallisation après criblage de différentes conditions avec le robot Cybio-HTPC (A/ et B/) dont certaines ont été optimisées manuellement en boîte 24 puits en utilisant la technique de goutte suspendue (C/).

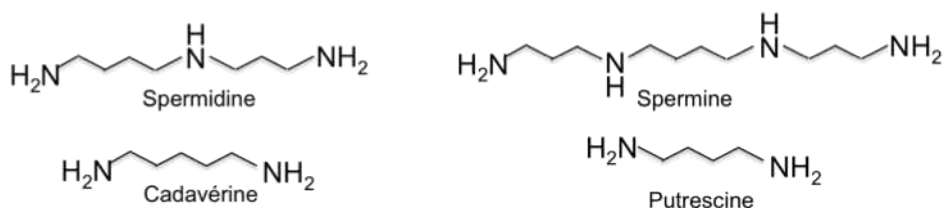
Plusieurs cristaux issus des boîtes Greiner et Linbro ont été testés sur les lignes ID29 de l'ESRF ou Proxima1 de SOLEIL. Malheureusement la meilleure diffraction obtenue à l'heure actuelle est de 8 Å, ce qui est insuffisant pour pouvoir résoudre la structure de ce mutant. De nouvelles optimisations seront donc nécessaires.

3.6.2. Electrophysiologie

L'électrophysiologie nous a déjà quant à elle permis de mesurer la conductance de la forme sauvage d'OprM. Nous espérons donc pouvoir observer une augmentation de cette conductance pour certains de nos mutants, reflétant une plus grande ouverture du canal de la porine. Nous devrions obtenir une mesure plus précise du niveau d'ouverture que par les expériences avec la vancomycine. Nous pourrions ainsi très probablement discriminer davantage les résidus importants pour le réarrangement des hélices périplasmiques. Trois mutants (OprM Y404F, OprM R403L-Y404F et OprM D416A-R419A) ont été purifiés en petite quantité et donné tout récemment à nos collaborateurs de l'équipe de Bruno Lepioufle à l'ENS Cachan, nous n'avons donc pas encore pu obtenir de valeurs pour l'instant.

3.7. Etude de l'effet des polyamines sur OprM

Une dernière étude a été menée dans l'objectif de rechercher un inhibiteur potentiel d'OprM à partir de molécules déjà connues pour leur blocage des porines. En effet, les polyamines (Fig. 79) sont des agents polycationiques retrouvés chez les eucaryotes animaux dans toutes les cellules (à l'exception de la cadavérine, d'origine bactérienne) et dont l'activité de modulation de canaux ioniques a été caractérisée depuis plus d'une décennie (Johnson 1996; Williams 1997; Williams 1997). De plus, il a également été montré que les polyamines pouvaient inhiber les porines OmpF et OmpC d'*Escherichia coli* (Samartzidou and Delcour 1999; Iyer, Wu *et al.* 2000). Cependant, plus récemment, un effet opposé a été observé sur la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* selon les familles d'antibiotiques: les polyamines induisent une résistance aux peptides cationiques, aux aminoglycosides et aux quinolones alors qu'elles génèrent une sensibilité accrue aux β -lactamines, au chloramphénicol ou encore au triméthoprim (Kwon and Lu 2006; Kwon and Lu 2006).

**Fig. 79 :** Structure des polyamines

A partir de ces informations bibliographiques, nous nous sommes demandés si cette sensibilité aux β -lactamines pouvait s'expliquer par un blocage d'OprM de manière similaire aux porines classiques d'*E. coli*, laissant ainsi entrevoir la possibilité de trouver un inhibiteur des pompes d'efflux. Le pharmacophore serait basé sur un squelette polyamine, et serait capable de potentialiser l'administration d'un traitement à base de β -lactamines. De plus, le mutant D371A-D374A de TolC (équivalent à notre mutant D416A-R419A d'OprM) n'étant plus sélectif vis-à-vis des ions (Andersen, Koronakis *et al.* 2002), il semblait que ces résidus de l'extrémité périplasmique soient un site de liaison pour les cations et donc un site potentiellement blocable par des polyamines.

Nous avons donc examiné l'effet de la spermine sur la résistance à la ticarcilline dans les souches de *Pseudomonas aeruginosa* dont nous disposions. Le choix de cet antibiotique particulier a été motivé par l'amplitude de variation de résistance observée entre la souche PAO1wt et la souche PAO1 Δ OprM (facteur 8 à 32) qui nous promettait de voir même des niveaux intermédiaires de résistance en présence de polyamines. L'étude a été menée par mesure de la CMI en milieu liquide sur 6 souches : 3 pour la souche PAO1wt et 3 pour la souche PAO1 Δ OprM, chacune étant exprimée seule, ou transformée par le vecteur pME6001 ou encore par le plasmide pME6001-OprMwt. Les résultats présentés dans la figure 80), confirment tout d'abord l'effet décrit par Kwon and Lu (2006) puisque l'on observe une diminution de la CMI d'un facteur 4 lorsque les souches sont incubées avec 1 mM de spermine. Le niveau de cet effet est similaire pour la souche PAO1wt et la souche PAO1 Δ OprM qui passent d'une CMI pour la ticarcilline de 16 à 4 et de 2 à 0,25 respectivement. La présence du vecteur seul dans les souches ne génère aucun effet particulier. Enfin, comme nous l'avons montré dans le paragraphe 3.2, en l'absence de polyamine, la complémentation de la souche PAO1 Δ OprM par le plasmide pME6001-OprMwt

permet de restaurer la résistance à un niveau similaire à celui de la souche PAO1wt (16 $\mu\text{g/mL}$). En présence de spermine à 1 mM, contrairement à notre hypothèse initiale, on restaure également la résistance de la souche mutante au même niveau que la souche sauvage (4 $\mu\text{g/mL}$). Ceci indique donc que la spermine a bien un effet sur la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux β -lactamines, mais que cet effet est indépendant d'une action du système d'efflux MexAB-OprM ou du moins de la porine OprM. Bien que décevants, ces résultats sont en accord avec les observations faites sur une souche mutante ΔAcrA d'*E. coli* qui écartent les pompes d'efflux comme mécanisme cible des polyamines (Kwon and Lu 2007).

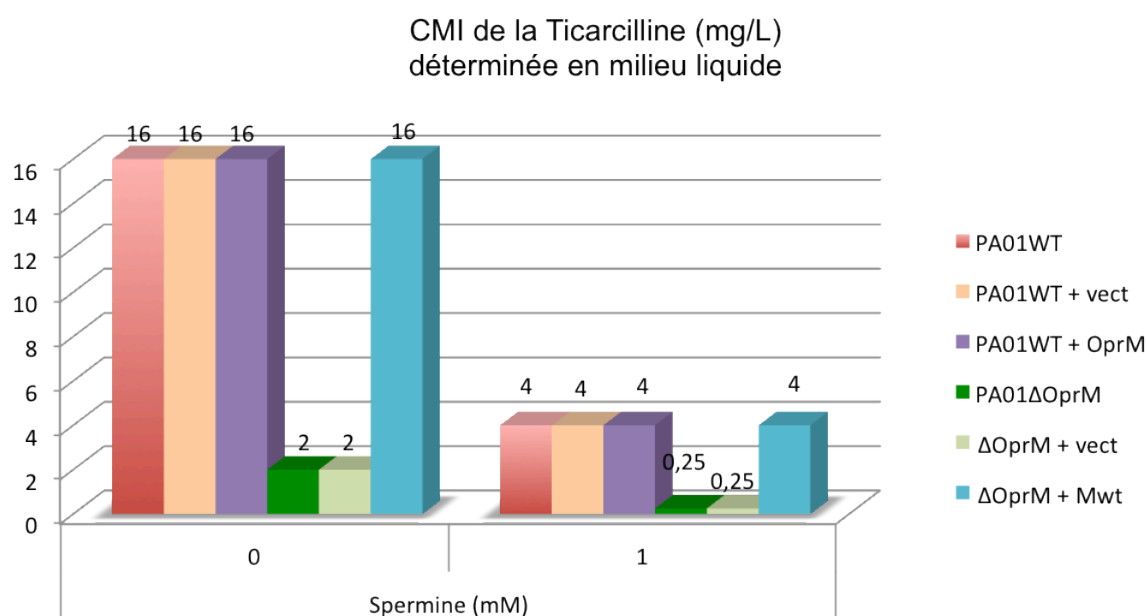


Fig. 80 : Effet de la spermine sur les souches PAO1wt et PAO1 Δ OprM

Les souches PAO1wt et PAO1 Δ OprM seules (en rouge et vert foncé respectivement) ou transformées par le plasmide pME6001 vide (en orange et vert clair respectivement) ou contenant le gène oprM sauvage (en violet et cyan respectivement) ont été cultivées en absence (à gauche) ou présence de spermine à 1 mM (à droite) et la résistance à la ticarcilline déterminée dans chacun des cas.

4. Modélisation de mutants cliniques

Dans le cadre de la collaboration établie avec le laboratoire de bactériologie de Besançon pour notre apprentissage des expériences de complémentation, l'équipe du Professeur Patrick Plésiat a fait appel à notre savoir-faire en biologie structurale pour modéliser le régulateur MexZ de la pompe MexXY-OprM et la porine d'entrée des carbapénèmes, OprD. Ces modélisations ont pour objectif de les aider à expliquer l'effet de mutations qu'ils ont pu retrouver au sein de souches cliniques multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1. Modélisation de MexZ

MexZ est le régulateur négatif de l'expression de *mexXY*. La répression qu'il exerce est levée en présence d'antibiotiques inducteurs. L'expression de la pompe MexXY-OprM qui en résulte, génère une résistance aux aminoglycosides. L'importance clinique de MexZ est illustrée par l'étude de Smith *et al.* dans laquelle 18 des 29 patients étudiés portent des mutations sur le gène *mexZ* responsable d'une résistance acquise aux antibiotiques (Smith, Buckley *et al.* 2006). L'étude de son mécanisme d'action et de sa régulation semble donc primordiale pour mieux comprendre l'adaptation et la résistance de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1.1. Construction du modèle de MexZ

Nous avons utilisé la séquence de MexZ de la souche PAO1 déposée sur la base de données de *Pseudomonas* (<http://www.pseudomonas.com/>) puis procédé à une modélisation de sa structure grâce au serveur CPHmodels (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) qui utilise les structures disponibles dans la Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) comme support de travail. Ce programme se base sur un alignement local de séquence des protéines en tenant compte des structures secondaires et des surfaces accessibles. La protéine identifiée comme possédant la plus forte homologie structurale avec MexZ était TtgR (code PDB : 2UXI) avec un Z-score de 2^{e-20} , les deux protéines possédant 70% d'homologie de séquence. Nous avons donc obtenu à partir de cette structure, un modèle du monomère de MexZ (Fig. 81A).

Nous accordons une grande confiance à la qualité de ce modèle aux vues de la proximité des deux protéines, tant d'un point de vue de leur séquence primaire que de leur architecture globale.

MexZ appartient à la famille des régulateurs TetR qui agissent sous la forme d'un dimère comme répresseurs en se liant sur le grand sillon de l'ADN par leur domaine HTH N-terminal. Nous avons donc généré le dimère de MexZ à partir de TtgR afin de pouvoir visualiser l'interface de dimérisation.

Nous avons enfin construit un modèle de MexZ lié à l'ADN afin d'analyser la surface d'interaction. Nous avons pour cela utilisé dans la base de données PDB une structure du complexe TetR/ADN qui porte le code 1QPI. Le modèle du complexe MexZ-ADN a été ensuite obtenu par simple superposition du dimère de MexZ sur celui de TetR grâce au programme COOT et en gardant comme ADN modèle celui de TetR (Fig. 81B). Notre modèle ayant pour objectif principal de localiser l'environnement des acides mutés, nous n'avons pas réalisé de minimisation des contacts entre le dimère de MexZ et l'ADN de TetR.

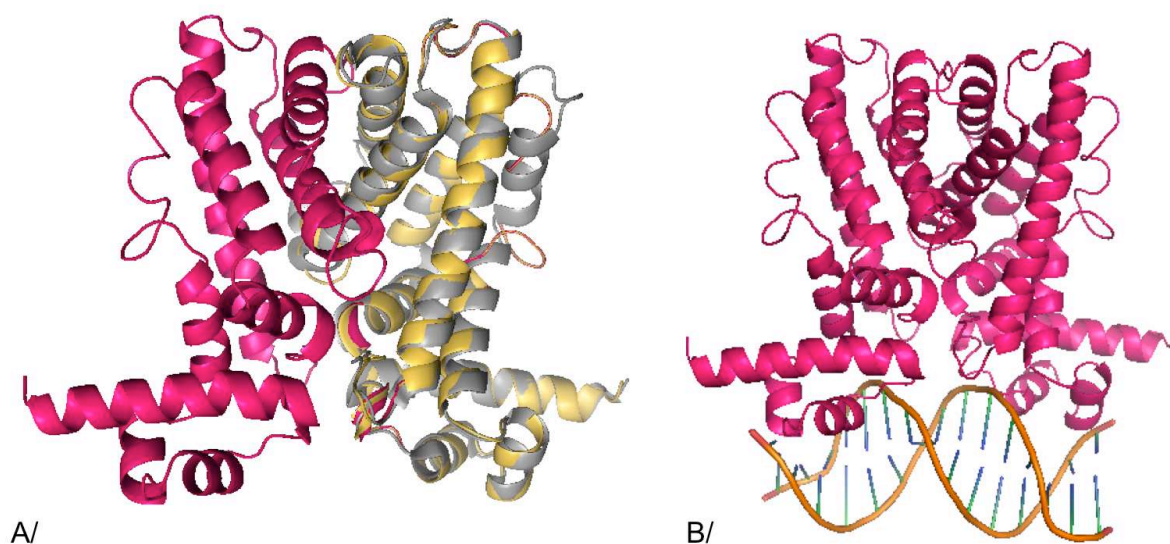


Fig. 81: Modélisation du répresseur MexZ

(A) *Modélisation de la structure en rubans d'un dimère de MexZ. Le premier monomère du modèle de MexZ est coloré en or et superposé avec le monomère de TtgR (couleur argent) ayant servi de référence. Le second monomère de MexZ est coloré en rose. (B) Modélisation du dimère de MexZ sous sa forme liée à l'ADN.*

4.1.2. Description générale de la structure cristallographique de MexZ

Au cours de notre travail de modélisation, la structure tridimensionnelle de MexZ (code PDB : 2WUI) a été résolue par Alguel, Lu *et al.* (2010). Cette structure, résolue dans le groupe d'espace H32, présente un monomère par unité asymétrique. MexZ possède bien, comme l'indiquait notre modèle, une structure toute en hélices α composée de neuf hélices. Les protéines de la famille TetR sont caractérisées par des domaines de liaisons à l'ADN conservés et des domaines de liaison de ligands variables (Ramos, Martinez-Bueno *et al.* 2005). On retrouve donc les hélices $\alpha 1$ - $\alpha 3$ qui correspondent au domaine de liaison à l'ADN (DBD pour *DNA binding domain*) et les hélices $\alpha 4$ - $\alpha 9$ qui constituent le domaine C-terminal (CTD) (Fig. 82A). Les hélices $\alpha 5$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ et la partie supérieure de l'hélice $\alpha 7$ forment un groupe d'hélices avec un cœur hydrophobe alors que les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 6$ et la partie inférieure de l'hélice $\alpha 7$ sont en liaison étroite avec le domaine DBD. Des changements au niveau du domaine CTD peuvent donc être transmis au domaine DBD le long de l'hélice $\alpha 7$.

Si l'on compare notre premier modèle à la structure cristallographique on obtient pour la forme monomérique un écart quadratique moyen (rmsd) de 3 Å calculé sur 183 C α atomes. Cet écart atteint 5,2 Å lorsque l'on superpose le dimère obtenu par symétrie cristallographique à notre modèle lié à l'ADN (Fig. 82B). Notre modèle est un peu plus étroit notamment au niveau du DBD. En effet, on observe un basculement des deux monomères l'un par rapport à l'autre qui permet l'ajustement du DBD sur l'ADN en rapprochant les hélices $\alpha 1$ - $\alpha 3$ du sillon de l'ADN. En revanche, la structure cristallographique du dimère de MexZ décrite par Alguel, Lu *et al.* (2010) semble être moins compatible avec l'insertion de ce domaine DBD dans les grands sillons de l'ADN (distance de 60 Å entre les hélices $\alpha 3$ contre 34 Å entre les sillons). Alguel, Lu *et al.* (2010) proposent d'ailleurs que la conformation adoptée dans le cristal corresponde à MexZ sous forme « activée », détachée de l'ADN, ce qui va dans le sens de la différence observée. La transition d'une forme à l'autre semble nécessiter un mouvement de « respiration » dont la charnière se situerait au milieu de l'hélice $\alpha 7$ à hauteur du

résidu Phe136. Nous avons par ailleurs pu conforter cette hypothèse de transition « forme ouverte » vers « forme liée » par une analyse en modes normaux. Toutefois, seule la résolution de la structure cristallographique de MexZ en complexe avec la séquence palindromique intergénique permettrait de valider complètement notre modèle.

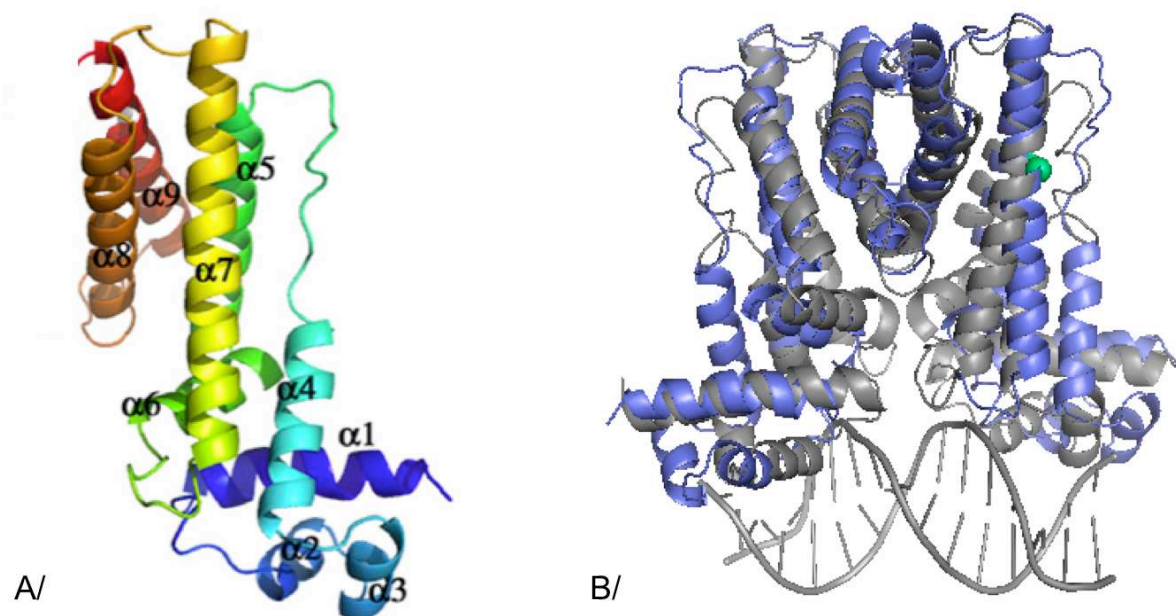


Fig. 82: Structure cristallographique du répresseur MexZ

(A/) Structure en rubans d'un monomère de MexZ (Alguet, Lu et al. 2010).
(B/) Superposition du dimère cristallographique de MexZ et de notre modèle de MexZ lié à l'ADN. Le dimère cristallographique est coloré en bleu et MexZ modélisé sous forme liée à l'ADN est coloré en gris. Le point charnière du mouvement permettant de passer d'une forme à l'autre est indiqué par une boule verte.

4.1.3. Analyse des mutations retrouvées sur les souches cliniques

Les mutations sur MexZ (mutations de type *agrZ*) retrouvées par l'équipe de P. Plésiat dans les souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* génèrent toutes une surexpression du système d'efflux MexXY. Toutefois, les conséquences de ces mutations ne sont pas toutes du même ordre et nous avons évidemment exclu pour notre modélisation tous les mutants correspondant à des

délétions ou des insertions qui aboutissent évidemment à la formation d'une protéine aberrante, pour ne garder que les substitutions d'acides aminés (Fig. 83).

Strains	Genotype	Mutations in gene <i>mexZ</i>	Alteration in protein MexZ	MIC (µg/mL)							<i>mexY</i> expression levels
				TOB	AMK	APR	CIP	FEP	CAZ	TIC	
PAO1Bes	Wild-type	-	-	0.5	4	16	0.125	4	2	16	1
4465	<i>agrZ</i>	C95A, G593T	T32N, S198I	2	16	64	0.125	8	2	32	25.9
4634	<i>agrZ</i>	C113T	A38V	128	16	256	16	8	16	64	30.4
3060	<i>agrZ</i>	T143C	V48A	1	8	64	32	16	4	64	23
2508	<i>agrZ</i>	GC584-585AA	G195E	128	8	32	32	16	4	32	18.9
2843	<i>agrZ</i>	C431T	A144V	0.5	4	32	0.5	8	2	16	15.2
3245	<i>agrZ</i>	G515A, T575A	G172D, F192Y	2	16	64	32	16	4	32	18.4
3229	<i>agrZ</i>	G149A	G50D	2	8	64	0.5	16	4	32	35.1
3135	<i>agrZ</i>	C382A	L128M	1	8	32	0.5	8	2	32	21.9
4173	<i>agrZ</i>	G176A	C59Y	2	16	64	0.5	8	2	16	13.5
2338	<i>agrZ</i>	G136A	G46S	1	8	32	0.5	8	2	32	21.5
2283	<i>agrZ</i>	T47C	I16T	1	32	64	8	16	2	16	36.7

Fig. 83: Caractéristiques des mutants cliniques de MexZ (mutants *agrZ*)

La résistance des mutants *agrZ* a été testée vis à vis de 7 antibiotiques : tobramycine (TOB), amikacine (AMK), apramycine (Apr), ciprofloxacine (CIP), céfépime (FEP), ceftazidime (CAZ) et ticarcilline (TIC). Le niveau d'expression de la pompe MexXY a été évalué par « reverse transcription » du gène *mexY*.

Afin de pouvoir émettre des hypothèses sur la relation entre mutation et phénotype nous avons représenté les différents mutants sur notre modèle de MexZ lié à l'ADN (Fig. 84). Ils se répartissent clairement en trois groupes :

- Le premier groupe représenté en bleu sur la figure 82, comprend les résidus Thr32, Gly46 et Gly50. Ces acides aminés se situent en contact direct avec l'ADN. Leur mutation en acides aminés possédant une chaîne latérale plus longue (T32N, G46S, G50D) semble pouvoir gêner la liaison de MexZ à l'ADN. Il en résulterait une dé-répression de l'expression de *mexXY*. C'est bien ce qu'observent nos collaborateurs par « reverse transcription », avec une expression de *mexY* supérieure de 20 à 30 fois comparée à la souche PAO1wt. Par ailleurs, une simple mutation de la glycine 46 en valine a également été décrite comme abolissant totalement

la liaison de MexZ sur un fragment de 39pb situé dans la région promotrice de *mexX* (Alguel, Lu *et al.* 2010).

- Le second groupe est constitué des acides aminés Gly172, Gly195 et Ser198, représentés en jaune sur la figure 84. Tous ces résidus composent l'interface de dimérisation. Leur mutation en Asp, Glu et Ile respectivement peut donc perturber la formation du dimère. En effet, l'introduction d'une gêne stérique (Ile) ou de charges de même nature (Asp, Glu) au niveau de l'interface va plutôt être défavorable à la formation du dimère dans une conformation telle que nous l'avons représentée dans notre modèle. Dans TtgR, qui est un autre membre de cette famille de régulateurs, le résidu équivalent à la Gly172 est l'Arg176, un acide aminé à longue chaîne dont la mutation en Gly ne modifie que très légèrement la fixation du ligand sans affecter les fonctions effectrices du régulateur (Daniels, Daddaoua *et al.* 2010). Toutefois il est possible que dans le cas de MexZ ces mutations aient un effet plus drastique sur le fonctionnement du régulateur sans modulation possible de l'effet par la fixation d'un ligand. En effet, MexZ n'interagit pas avec les petites molécules qui induisent l'expression de la pompe MexXY bien qu'il possède une cavité similaire à la poche de liaison retrouvée chez d'autres protéines de la famille TetR.
- Le dernier groupe comporte des résidus distribués tout au long du reste de la structure. Situés au cœur de la structure (Cys59 et Phe192) ou aux interfaces entre hélices (Ile16, Ala38, Val48, Ala144), ces acides aminés mutés peuvent perturber la structure tridimensionnelle de MexZ. Hormis cet aspect structural, quelques autres points sont à souligner concernant ces acides aminés. Phe192 fait partie de la poche de liaison des antibiotiques décrite dans plusieurs membres de la famille TetR et le mutant clinique touché par cette mutation présente en plus la mutation G172D située dans l'hélice $\alpha 8$ non loin de l'extrémité inférieure de cette poche de fixation. Comme MexZ ne semble pas fixer de ligand, on peut donc imaginer que la combinaison de ces deux mutations mime les changements structuraux induits par la fixation d'un antibiotique afin de

lever la répression transcriptionnelle. La Cys59 se situe au bas de l'hélice $\alpha 4$ supposée impliquée dans la transmission des changements conformationnels au domaine DBD. Sa mutation en Tyr peut donc rigidifier localement l'hélice et empêcher cette transmission. L'Ala38 se situe sur l'hélice $\alpha 2$ à proximité de l'ADN sur notre modèle. Bien que ce soit l'hélice $\alpha 3$ (résidus 45-53) qui soit considérée comme l'hélice de reconnaissance de l'ADN, Ala38 pourrait également faire partie des acteurs de la liaison à l'ADN.

Enfin, la mutation touchant la leucine 128 semble plus difficile à expliquer car elle se situe sur la surface extérieure de la molécule. Cependant, dans la structure de SimR, un régulateur transcriptionnel de la famille TetR chez *Streptomyces antibioticus*, deux hélices supplémentaires insérées entre l'hélice C-terminale et l'extension N-terminale et couvrant la région contenant le résidu équivalent à Leu128 semblent jouer un rôle régulateur (Le, Schumacher *et al.* 2011). On peut donc émettre l'hypothèse que la mutation L128M compromette la régulation de MexZ, peut être au travers d'une interaction avec un autre partenaire tel que le produit du gène PA5471 dont on sait qu'il interagit avec MexZ, réduit sa liaison à l'ADN et augmente l'expression de MexX (Morita, Sobel *et al.* 2006; Yamamoto, Ueda *et al.* 2009).

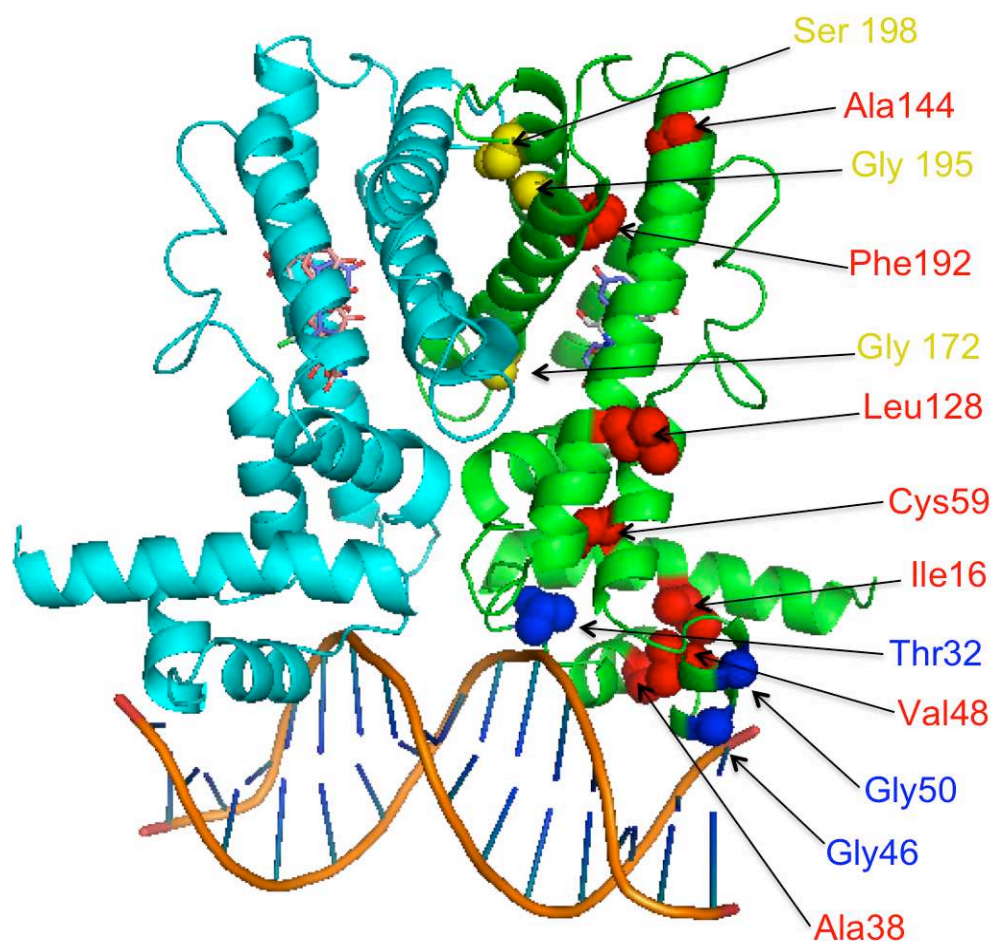


Fig. 84: Localisation des acides aminés mutés des souches cliniques *agrZ* sur le modèle de MexZ lié à l'ADN

Les monomères du modèle de MexZ sont colorés en cyan et vert. Les mutations sont matérialisées par des boules représentant les chaînes latérales des acides aminés et colorées en bleu pour celles impliquées dans la liaison à l'ADN, en jaune pour celles situées à l'interface du dimère et en rouge pour toutes les autres. Les ligands (Tétracycline, Chloramphénicol et Naringénine) retrouvés dans les structures complexées de TtgR sont indiqués afin de matérialiser l'hypothétique poche d'interaction des ligands.

4.2. Modélisation d'OprD

Notre collaboration avec le laboratoire de bactériologie de Besançon s'est renforcée suite à une demande du docteur Catherine Llanes de modélisation de mutants de la porine OprD. L'étude qu'elle mène vise à caractériser des souches collectées dans dix centres hospitaliers français et isolées à partir de crachats de patients atteints de la mucoviscidose.

Toutes ces souches présentent une résistance accrue à l'imipénème associée parfois à une résistance aux autres carbapénèmes (méropénème et doripénème). Classiquement, trois mécanismes peuvent être responsables d'une résistance aux carbapénèmes : l'expression par le pathogène de carbapénémases (Hocquet, Plesiat *et al.* 2010; Borgianni, Prandi *et al.* 2011), la surexpression des systèmes d'efflux (Quale, Bratu *et al.* 2006) ou encore un influx réduit de ces antibiotiques consécutif à des modifications de la porine OprD (Yoneyama and Nakae 1993). La plupart des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes présentent des altérations au niveau de la porine OprD mais c'est uniquement la résistance à l'imipénème qui est la signature de ce type de mécanisme de résistance. En effet, une résistance accrue au méropénème et au doripénème peut résulter d'une sur-expression du système d'efflux MexAB-OprM contrairement à l'imipénème qui n'est pas substrat de cette pompe.

4.2.1. Structure générale et variabilité inter-souches

Si les autres beta-lactamines pénètrent via la porine OprF chez *Pseudomonas aeruginosa*, OprD est la voie d'entrée spécifique des carbapénèmes et des acides aminés basiques. La structure de cette porine de la souche PAO1 a été résolue récemment (Biswas, Mohammad *et al.* 2007) afin de mieux comprendre le mécanisme de transport des substrats par cette famille de protéines. Contrairement aux porines classiques, OprD semble être monomérique ou former des trimères labiles. Sa structure comprend un tonneau β formé de 18 feuillets et de nombreuses boucles du côté extracellulaires parmi lesquelles les boucles L3 (127-130) et L7 (295-297) sont responsables de la forte constriction du pore (5,5 Å) (Fig. 86).

L'étude à laquelle nous participons, porte sur des souches cliniques dérivées des souches PA14 et LESB58 de *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons donc regardé dans un premier temps quelle était la variabilité entre les séquences protéiques d'OprD de ces différentes souches. L'alignement montre une forte identité de séquence (Fig. 85) et les acides aminés qui varient se concentrent principalement au niveau des boucles (Fig. 86). D'ailleurs si on prend l'exemple de la souche LESB58 les variations S34E, S36R et R287G ne sont pas visibles dans la structure cristallographique d'OprD car situées sur des boucles flexibles. La variabilité des acides aminés de la région 349-360 correspond à une grande boucle qui dépasse de la structure. Enfin, les autres résidus variables de cette souche pointent très souvent vers l'extérieur de la structure sauf l'acide aspartique D20 mais sa substitution par une asparagine peut être considérée comme suffisamment conservatrice pour ne pas induire de modification structurale (fonction hydroxyle changée en fonction amine). De même dans PA14, 6 des 8 acides aminés sont localisés dans des régions non visibles sur la structure cristallographique d'OprD (T80S, K92T, E162Q, P163G, V166T et R287E) alors que F147L est sur une boucle périplasmique et orientée vers l'extérieur. La variation A292G, peu drastique, concerne un acide aminé juste en amont de la boucle L7 impliquée dans la fermeture de la porine. Enfin, la variabilité des acides aminés de PA7 se concentre sur trois résidus dont les chaînes latérales pointent vers l'extérieur (V104L, L372F et N407D) et trois autres localisés dans des boucles non impliquées dans la fermeture de la porine (V303I, L324M et S225E). La variation G37R est localisée sur une boucle non décrite dans la structure cristallographique (trop mobile). On observe donc que la variabilité entre les souches porte sur des substitutions conservatrices (V303I, V104L, T80S) ou tout du moins qui conservent le caractère polaire ou apolaire des résidus, à l'exception de V166T. Ces variations ne semblent donc pas avoir d'impact structural significatif, ce qui explique pourquoi, d'un point de vue fonctionnel, les différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* présentent des CMI très proches.

Numérotation prot nature							
OprD_PA01	1	MKVMKWSAIA	LAVSAGSTQF	AVADAFVSDQ	AEAKGFIEDS	SLDLLLRNYY	FNRDGKSGSG
OprD_LESB58	1	MKVMKWSAIA	LAVSAGSTQF	AVADAFVSDQ	AEAKGFIEDS	SLNLLLRNYY	FNRDGKEGRG
OprD_PA14	1	MKVMKWSAIA	LAVSAGSTQF	AVADAFVSDQ	AEAKGFIEDS	SLDLLLRNYY	FNRDGKSGSG
OprD_PA7	1	MKVMKWSAIA	LAVSAGSTQF	AVADAFVSDQ	AEAKGFIEDS	SLDLLLRNYY	FNRDGKSGSR
OprD_PA01	61	DRVDWTQGF	TTYESGFTQG	TVGFGVDAFG	YLGLKLDGTS	DKTGTGNLPV	MNDGKPRDDY
OprD_LESB58	61	DRVDWTQGF	TTYESGFTQG	TVGFGVDAFG	YLGLKLDGTS	DKTGTGNLPV	MNDGKPRDDY
OprD_PA14	61	DRVDWTQGF	TTYESGFTQG	TVGFGVDAFG	YLGLKLDGTS	DKSGTGNLPV	MNDGTPRDDY
OprD_PA7	61	DRVDWTQGF	TTYESGFTQG	TVGFGVDAFG	YLGLKLDGTS	DKTGTGNLPV	MNDGKPRDDY
OprD_PA01	121	SRAGGAVKVR	ISKTMLKWGE	MQPTAPVFAA	GGSRLLFPQTA	TGFQLQSSEF	EGLDLEAGHF
OprD_LESB58	121	SRAGGAVKVR	ISKTMLKWGE	MQPTAPVFAA	GGSRLLFPQTA	TGFQLQSSEF	EGLDLEAGHF
OprD_PA14	121	SRAGGAVKVR	ISKTMLKWGE	MQPTAPVFAA	GGSRLLFPQTA	TGFQLQSSEL	EGLDLEAGHF
OprD_PA7	121	SRAGGALKVR	ISKTMLKWGE	MQPTAPVFAA	GGSRLLFPQTA	TGFQLQSSEF	EGLDLEAGHF
OprD_PA01	181	TEGKEPTTVK	SRGELYATYA	GETAKSADFI	GGRYAITDNL	SASLYGAELE	DIYRQYYLNS
OprD_LESB58	181	TEGKEPTTVK	SRGELYATYA	GQTAKSADFA	GGRYAITDNL	SASLYGAELE	DIYRQYYLNT
OprD_PA14	181	TEGKQGTTTK	SRGELYATYA	GETAKSADFI	GGRYAITDNL	SASLYGAELE	DIYRQYYLNS
OprD_PA7	181	TEGKQGTTTK	SRGELYATYA	GQTAKSADFA	GGRYAITDNL	SASLYGAELE	DIYRQYYLNT
OprD_PA01	241	NYTIPLASDQ	SLGFDFNIYR	TNDEGKAKAG	DISNTTWSLA	AAYTLDAHTF	TLAYQKVHGD
OprD_LESB58	241	NYTIPLASDQ	SLGFDFNIYR	TTDEGKSKAG	DISNTTWSLA	GAYTLDAHTF	TLAYQQVHGD
OprD_PA14	241	NYTIPLASDQ	SLGFDFNIYR	TNDEGKAKAG	DISNTTWSLA	AAYTLDAHTF	TLAYQKVHGD
OprD_PA7	241	NYTIPLAEDQ	SLGFDFNIYR	TTDEGKSKAG	DISNTTWSLA	GAYTLDAHTF	TLAYQQVHGD
OprD_PA01	301	QPFDYIGFGR	NGSGAGGDSI	FLANSVQYSD	FNGPGEKSWQ	ARYDLNLASY	GVPGITFMVR
OprD_LESB58	301	EPFDYIGFGR	NGSGAGGDSI	FLANSVQYSD	FNGPGEKSWQ	ARYDLNLASY	GVPGITFMLR
OprD_PA14	301	QPFDYIGFGE	NGSGGGGDSI	FLANSVQYSD	FNGPGEKSWQ	ARYDLNLASY	GVPGITFMVR
OprD_PA7	301	EPFDYIGFGE	NNSGGGGDSI	FLANSIQYSD	FNGPGEKSWQ	ARYDLNMASY	GVPGITFMVR
OprD_PA01	361	YINGKDIDGT	KMSDNNVGKY	NYGYGEDGKH	HETNLEAKYV	VQSGPAKDLS	FRIRQAWHRA
OprD_LESB58	361	YINGKDIDGT	KVDSSSS-YA	GL-YGEDGKH	HETNLEAKYV	VQSGPAKDLS	FRIRQAWHRA
OprD_PA14	361	YINGKDIDGT	KMSDNNVGKY	NYGYGEDGKH	HETNLEAKYV	VQSGPAKDLS	FRIRQAWHRA
OprD_PA7	361	YINGKDIDGT	KVDSSSA-YA	GL-YGEDGKH	HETNFEAKYV	VQSGPAKDLS	FRIRQAWHRA
OprD_PA01	421	NADQGEQDN	EFRLIVDYPL	SIL			
OprD_LESB58	419	NADQGEQDN	EFRLIVDYPL	SIL			
OprD_PA14	421	NADQAEQDN	EFRLIVDYPL	SIL			
OprD_PA7	419	NADQGEQDN	EFRLIVDYPL	SIL			

Fig. 85 : Alignement des séquences protéiques d'OprD de plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa*

Les acides aminés strictement conservés entre les différentes souches sont indiqués en rouge. Les acides aminés qui varient par rapport à la souche PAO1 sont colorés en bleu (acides aminés similaires) et en noir (acides aminés différents). Les résidus visibles dans la structure cristallographique d'OprD sont surlignés en jaune.

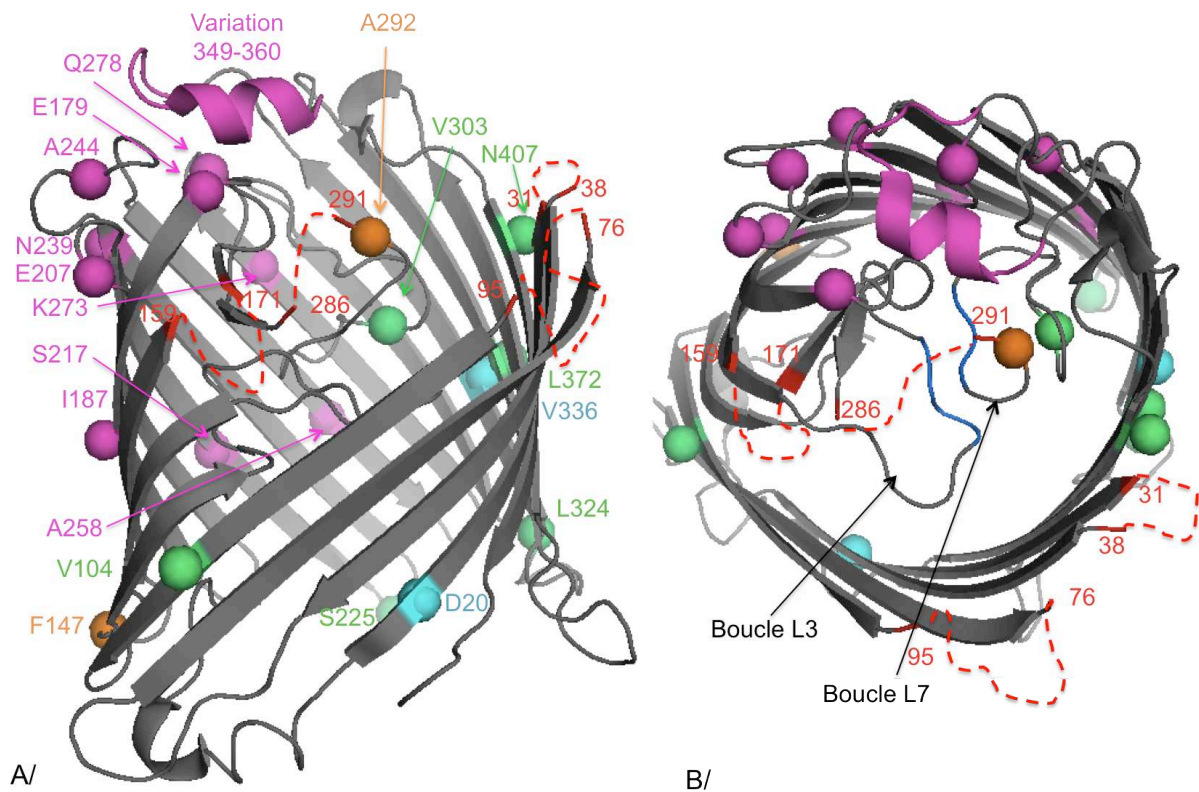


Fig. 86: Visualisation des acides aminés variables d'OprD issus de plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa*

(A/) Vue parallèle à la membrane de la structure d'OprD de PAO1. (B/) Vue de dessus de la porine OprD. Les acides aminés qui diffèrent par rapport à la souche PAO1 sont représentés par des boules. Les variations des souches PA14, LESB58 et PA7 sont colorées respectivement en orange, cyan et vert. Les acides aminés variables communs aux souches LESB58 et PA7 sont indiqués en rose. Les boucles d'OprD non visibles dans la structure cristallographique sont matérialisées par des pointillés rouges. La zone comprenant les résidus des boucles L3 et L7 impliqués dans la constriction du pore du côté extracellulaire est colorée en bleu foncé.

4.2.2. Evaluation de l'impact structural et fonctionnel des mutations retrouvées dans les souches cliniques

Les souches cliniques recueillies par nos collaborateurs présentent des niveaux variables de résistance à l'imipénème (0,5 à 32 µg/mL) par rapport aux souches sauvages correspondantes (Fig. 87). Si la plupart des souches présentaient des mutations introduisant un codon stop ou un décalage du cadre de lecture responsables de la formation d'une protéine tronquée ou aberrante, d'autres possédaient une séquence identique à la protéine sauvage (souches 7-3, 7-4, 7-7, 7-20 et 10-16). Dans ces isolats, le niveau de résistance accrue à l'imipénème a pu être corrélée, par RT-qPCR, à une sous expression du gène *oprD*, confirmée également par Western Blot. Dans le cadre de notre étude structurale nous nous sommes intéressés au troisième type de modifications : les substitutions d'acides aminés. Les souches mutantes que nous analysons se répartissent de la façon suivante: 1 variant de la souche PAO1 (souche Val02), 2 variants de la souche PA14 (souches 5-17 et 6-20), 7 mutants de la souche LESB58 (souches 1-2, 1-10, 1-13, 1-17, 5-11, PBI06 et GAR05) et 3 souches intermédiaires entre PA14 et LESB58 dont la séquence se rapproche plus nettement de la souche PA7 et qui présentent des mutations communes (Fig. 88 et 89).

Après avoir distingué les acides aminés responsables de la variabilité entre les souches, on peut noter que les souches dérivées de la souche LESB58, de PAO1 et PA14 ne présentent qu'une à deux mutations, il sera donc assez facile de relier le changement d'acide aminé à l'effet observé. En revanche, les souches mixtes présentent des profils plus complexes (5 à 7 mutations) et il semble donc plus difficile de prédire le poids de chaque mutation sur la résistance observée.

L'objectif est ici pour nous, en fonction du caractère conservatif ou non des substitutions et du rôle structural apparent des acides aminés mutés, de déterminer si les mutations peuvent induire des changements structuraux ou une déstabilisation thermodynamique de la protéine dans son environnement membranaire ; tout ceci dans le but d'identifier plus spécifiquement les mutations pouvant avoir un rôle fonctionnel dans l'efflux. A cette fin, nous avons donc

représenté graphiquement les mutations avec le logiciel Pymol, dans leur environnement moléculaire.

Souche		Souche de ref	CMI µg/mL)			WB
			IPM	MER	DOR	
PAO1	PAO1wt	/	1	0,5	0,5	++
	VAL02	PAO1 + mutation	8	2	2	++
LESB58	7-3	LESB58	32	64	128	+
	7-4	LESB58	8	16	16	+
	7-7	LESB58	8	2	1	+
	7-20	LESB58	8	2	6	+
	10-16	LESB58	8	0,5	1	+
	1-2	LESB58 + deletion	4	?	?	?
	1-10	LESB58 + mutation	16	4	8	-
	1-13	LESB58 + mutation	32	4	2	-
	1-17	LESB58 + mutation	16	4	2	-
	5-11	LESB58 + mutation	32	8	8	-
	PBI06	LESB58 + mutation	>256	>128	128	-
	GAR05	LESB58 + mutation	8	2	2	+
PA14	5-17	PA14 + mutation	2	0,5	0,5	++
	6-20	PA14 + mutations	8	1	2	+
Mixtes	6-5	LESB58/PA14 + mutations	64	16		-
	GAR02	LESB58/PA14 + mutations	8	2	2	++
	CLI03	LESB58/PA14 + mutations	32	32	8	-

Fig. 87: Tabelau présentant les caractéristiques phénotypiques des principales souches mutantes d'OprD

Pour chaque souche clinique isolée, la CMI pour les trois carbapénèmes (Imipénème (IPM), Méropénème (MER) et Doripénème (DOR) a été mesurée. La présence de la protéine a été recherchée dans la fraction de la membrane externe par Western Blot (WB) et sa quantité évaluée par rapport à la souche PAO1wt : (++) correspond à une quantité importante et similaire à la souche de référence, (+) correspond à une protéine sous-produite et (-) à l'absence d'OprD dans la fraction étudiée.

Partie III – Résultats & Discussion

Chapitre IV – Modélisation de mutants cliniques

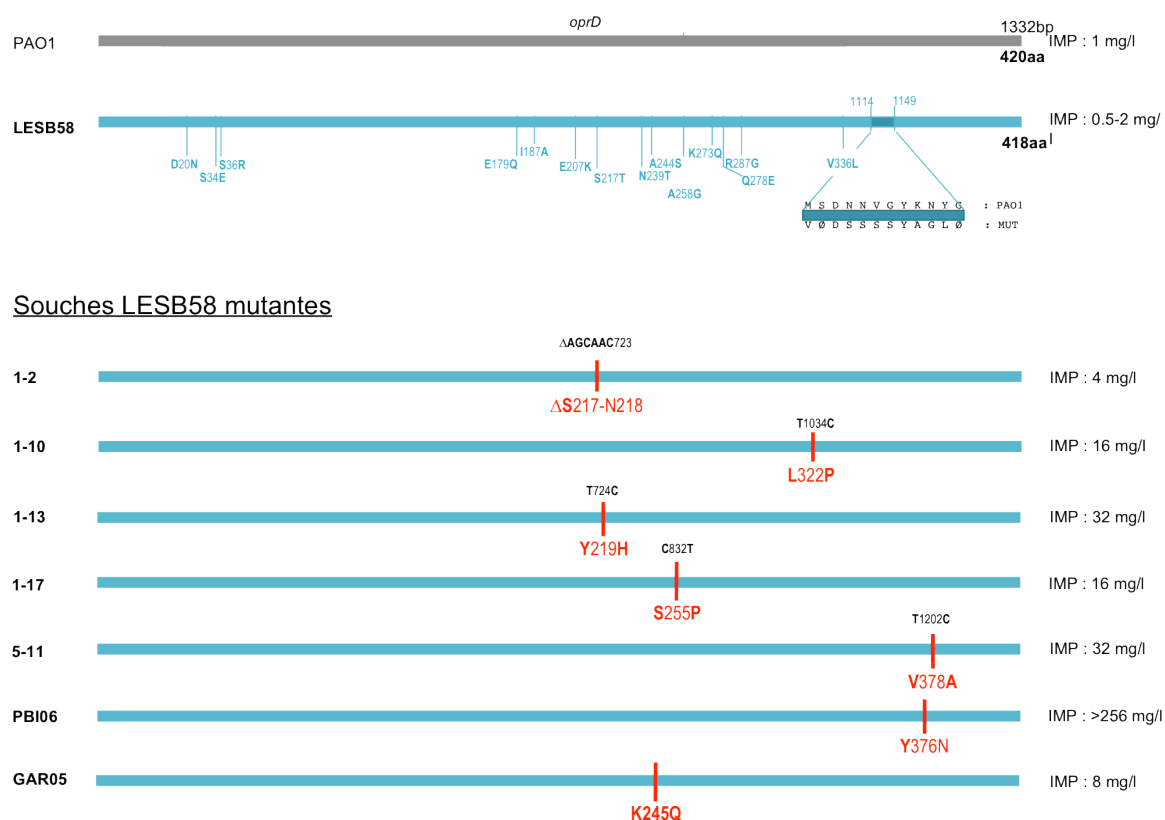
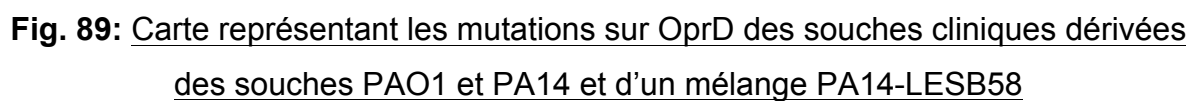


Fig. 88: Carte représentant les mutations sur OprD des souches cliniques dérivées la souche LESB58 de *Pseudomonas aeruginosa*

Les séquences protéiques sont matérialisées par des bandes de couleur (gris pour la souche PAO1, cyan pour la souche LESB58 et ses dérivées mutantes). Les variations d'acides aminés sont indiquées sur la partie inférieure de la bande. Les mutations retrouvées dans les souches cliniques sont indiquées en rouge.

Chapitre IV – Modélisation de mutants cliniques



210

4.2.2.1. Souches mutantes « simples »

4.2.2.1.1. Mutants de LESB58

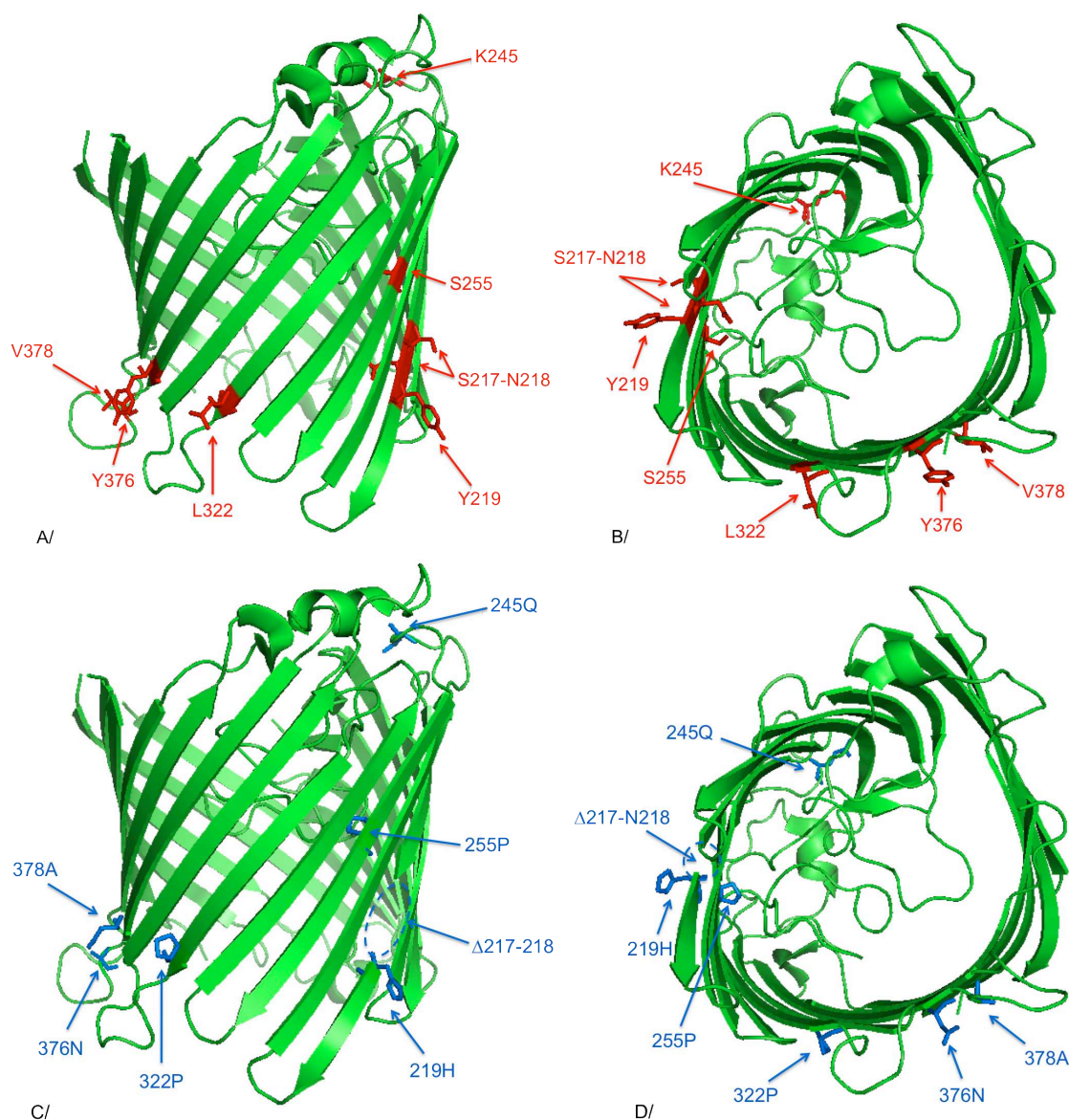


Fig. 90: Localisation des acides aminés mutés dans les souches dérivés de LESB58 sur la structure d'OprD

A/ et C/ Vue parallèle à la membrane de la structure d'OprD avant (A/) et après mutation (C/). B/ et D/ Vue par en dessous de la structure d'OprD avant (B/) et après mutation (D/). Les chaînes latérales des acides aminés avant mutation (colorés en rouge) et après mutations (colorés en bleu) sont mises en exergue sur les quatre figures.

La souche 1-2 présente une délétion de deux acides aminés (S217 et N218). Ces acides aminés sont localisés sur un feuillet présentant un β -turn au niveau des résidus voisins S225 et D226, largement exposés au solvant (Fig. 90). L'effet d'une telle délétion peut être modélisée par un décalage des acides aminés suivants qui maintient toutefois la structure du brin β inchangée avec la préservation notamment, d'une alternance, caractéristique de cette région, de résidus polaires et apolaires exposés au solvant vers l'intérieur du pore ou exposés à l'espace membranaire. Le raccourcissement du feuillet β ainsi généré ne doit pas avoir de conséquences trop importantes puisque le turn S225-D226 va rester exposé au solvant du côté cytoplasmique (Fig. 91). Cette hypothèse est validée par l'augmentation modérée de la CMI induite par cette délétion (4 mg/L au lieu de 1 mg/L). On peut en revanche imaginer qu'une rupture de l'alternance polaires/apolaires dans le cadre de la délétion d'un seul acide aminé de cette zone ait une répercussion plus préjudiciable.

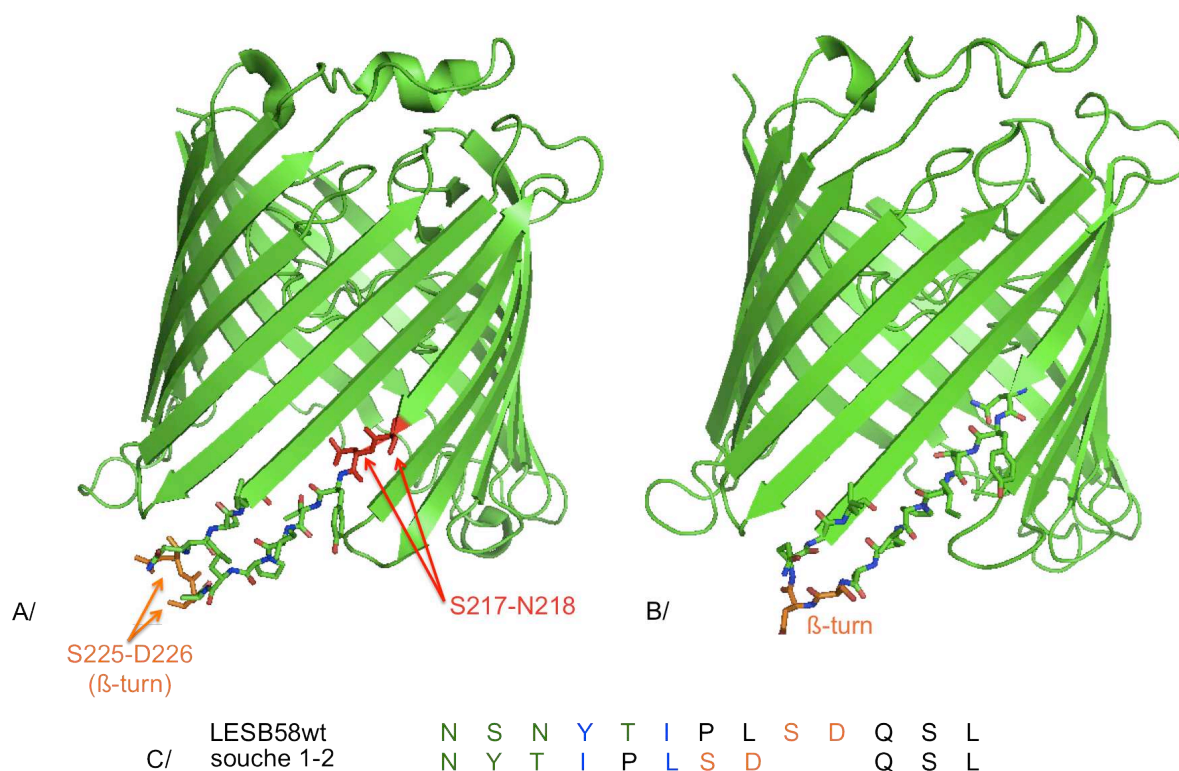


Fig. 91: Visualisation de l'effet de la délétion S217-N218

(A) La délétion des acides aminés S217 et N218 représentés en rouge va entraîner un décalage du β-turn (B), formé par les acides aminés S225 et D226, représentés en orange. Le décalage de la séquence des acides aminés est représenté en (C) avec la conservation du caractère polaire ou apolaire des acides aminés indiquée par les couleurs vertes et bleues respectivement.

Deux mutations (L322P et S255P) vont transformer les acides aminés considérés en proline. La mutation L322P touche un acide aminé localisé à la sortie d'un feuillet β (Fig. 90) alors que la mutation S255P observée dans la souche 1-17 concerne un acide aminé localisé au centre d'un feuillet β et dont la chaîne latérale pointe vers l'intérieur de la porine. L'introduction d'une proline va principalement induire la rupture de la liaison hydrogène que peut faire chacun de ces acides aminés mutés avec l'acide aminé situé sur le brin β adjacent. C'est ce que l'on observe dans le cas de la sérine 255 où la liaison hydrogène avec l'azote de l'asparagine N234 va être rompue (Fig. 92). Pour la leucine 322 outre la liaison hydrogène perdue entre l'azote de la leucine et la phénylalanine 334, l'introduction d'une proline va générer un encombrement stérique qui va probablement destabiliser le feuillet au niveau du résidu Phe334 (Fig. 92 C et D). L'apparition de ces prolines n'a qu'un effet modéré sur l'augmentation de la CMI alors que la protéine n'est pas retrouvée dans les extraits de membrane externe par Western Blot, il est donc envisageable que la protéine présentant l'une ou l'autre de ces mutations ne soit pas stable dans la membrane et soit donc relativement rapidement dégradée.

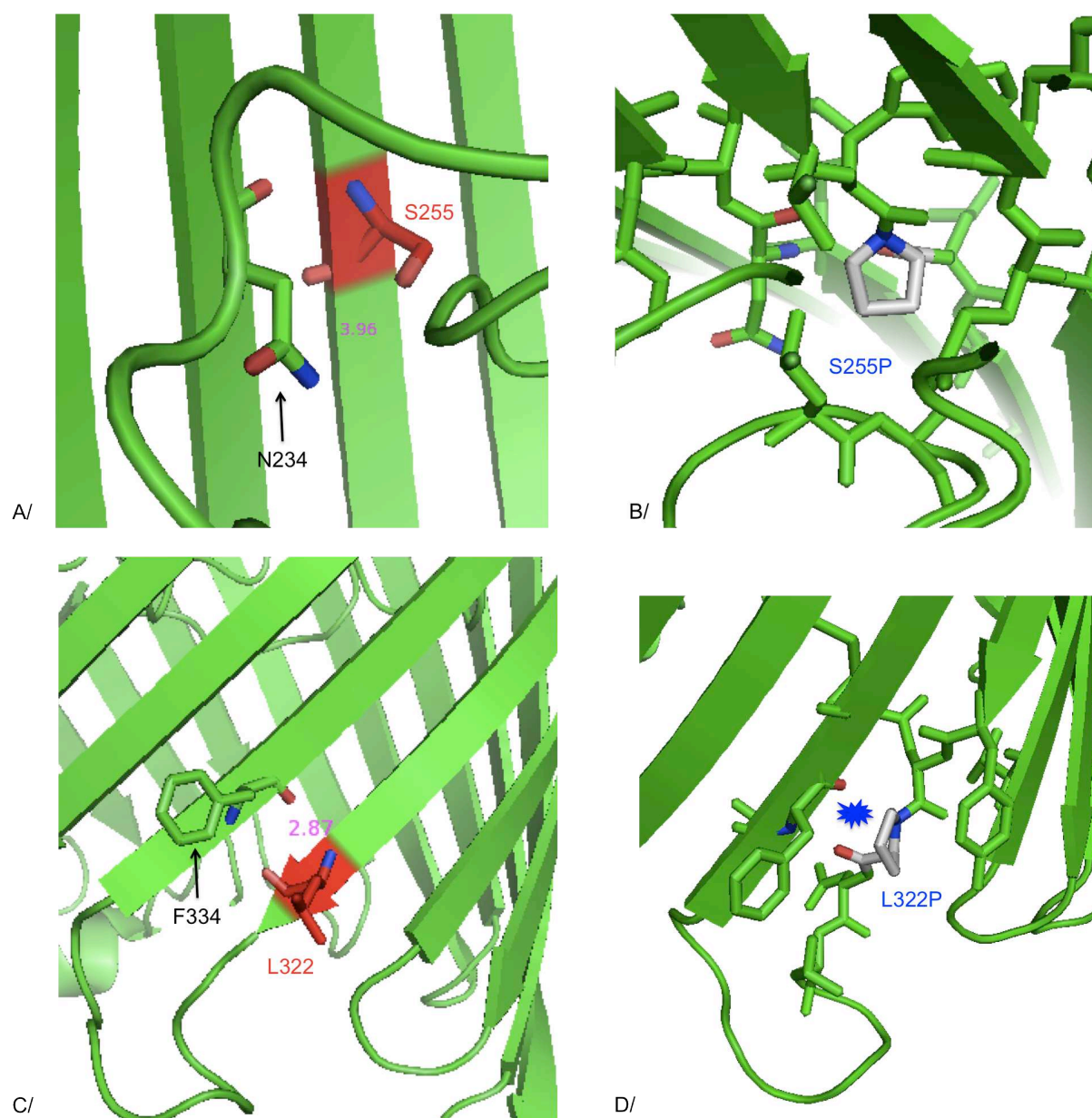


Fig. 92: Zoom sur les régions concernées par les mutations S255P et L322P d'OprD de la souche LESB58 de *Pseudomonas aeruginosa*

(A/) Visualisation de la liaison hydrogène entre les acides aminés S255 et N234 dans la forme sauvage d'OprD de la souche LESB58. (B/) Visualisation de la mutation S255P. (C/) Visualisation de la liaison hydrogène entre les acides aminés L322 et F334 dans la forme sauvage d'OprD de la souche LESB58. (D/) Visualisation de la mutation L322P qui va générer un encombrement stérique représenté en bleu. Les distances des liaisons hydrogène sont indiquées en rose.

La mutation Y219H provoque une augmentation importante de la CMI pour l'imipénème alors que cet acide aminé est situé à l'extérieur de la structure (Fig. 87 et 88). L'effet observé n'est donc pas attribuable à une modification de l'affinité de liaison de l'antibiotique. De plus, la mutation observée ici conserve un encombrement stérique à peu près identique. La nature polaire de l'acide aminé à cette position, partiellement exposé au solvant, reste inchangée. Toutefois l'introduction d'une histidine ajoute un groupement polaire supplémentaire par rapport à la tyrosine ce qui pourrait être défavorable dans l'environnement hydrophobe de la membrane. Dans un tel cas, il est probable que l'acide aminé ait besoin de former une liaison hydrogène avec des résidus à proximité. L'asparagine 196 située dans la boucle voisine, pourrait être un candidat pour cette liaison (Fig. 93A). Cela nécessiterait alors un réarrangement local de la protéine qui pourrait perturber sa stabilité mais cela n'expliquerait pas une telle variation de la CMI. En revanche, l'acide aminé muté est situé en bordure de la membrane du côté périplasmique. L'hypothèse qui paraît la plus pertinente pour expliquer la résistance de la souche 1-13 est que cette histidine apparue suite à la mutation soit chargée positivement dans l'environnement acide de l'espace périplasmique. Cette charge hypothétique pourrait déstabiliser l'insertion d'OprD dans la membrane.

La Valine 378 mutée dans la souche 5-11 est en interaction de Van der Waals avec plusieurs résidus hydrophobes. Son remplacement par une alanine constitue une substitution qualifiée de conservative qui ne devrait pas avoir beaucoup d'effet. En effet il y aura tout au plus une légère diminution du caractère hydrophobe de l'acide aminé, l'alanine étant un résidu peu hydrophobe pouvant être exposée au solvant. L'effet structural de cette mutation sera quant à lui réduit ce qui est en contradiction avec les observations cliniques (CMI relativement élevée : 32 mg/L et absence de la protéine en Western Blot). Toutefois, cette mutation est située dans une zone présentant une boucle (378-386) et dans laquelle on retrouve deux autres mutations dans les souches cliniques étudiées (Y376N pour la souche PBI06 de LESB58 et S380P dans la souche 6-20 de PA14) avec dans les trois cas

une absence de la protéine dans la membrane externe déterminée par western blot. Aux vues de ces quelques données nous pouvons juste émettre l'hypothèse que cette boucle a une importance fonctionnelle pour OprD. Cette hypothèse est renforcée par les observations de Biswas, Mohammad *et al.* (2007), qui indiquent que certains résidus sont strictement conservés chez les membres de la famille des porines « OprD-like ». Parmi eux se trouve un groupe rassemblant des résidus localisés dans l'extrémité périplasmique des feuillets S2, S3 et S4, sans y trouver une réelle signification biologique. Bien que la boucle concernée par les mutations V378A, Y376N et S380P n'appartienne pas à ces feuillets, elle est située dans la même zone proche de l'espace périplasmique et contient des résidus également très fortement conservés, laissant augurer de leur importance d'un point de vue fonctionnel. C'est le cas d'ailleurs pour l'acide aminé Y376 dont la mutation en asparagine va induire une CMI très élevée (>256 µg/mL pour l'imipénème et >128 µg/mL pour le méropénème et l'imipénème) pour la souche PBI06. Pour expliquer cet effet, on peut noter ici que la tyrosine est située dans un cluster hydrophobe comprenant les acides aminés F388, V378, V329 et L332 et qu'elle joue le rôle de cœur hydrophobe de cette région (Fig. 93B). Sa mutation en asparagine va donc fortement destabiliser ce cluster et l'importance de cette tyrosine est soulignée par sa stricte conservation parmi toutes les protéines qualifiée « OprD like ».

La lysine 245 forme un pont salin avec E179 dans PAO1 et PA14 ou est en liaison électrostatique avec Q179 dans les souches LESB58 et PA7) (Fig. 93C). La mutation K245Q dans le cadre de la souche GAR05 de LESB58 permet de conserver cette liaison mais diminue la force de la liaison électrostatique (2 charges partielles au lieu d'une charge partielle + une charge entière) au sein de cette zone très polaire en extrémité de feuillets. Les β -turns pourraient être légèrement déstabilisés mais cela sans grande répercussion sur la protéine puisque cette mutation est associée à une variation modeste de la CMI.

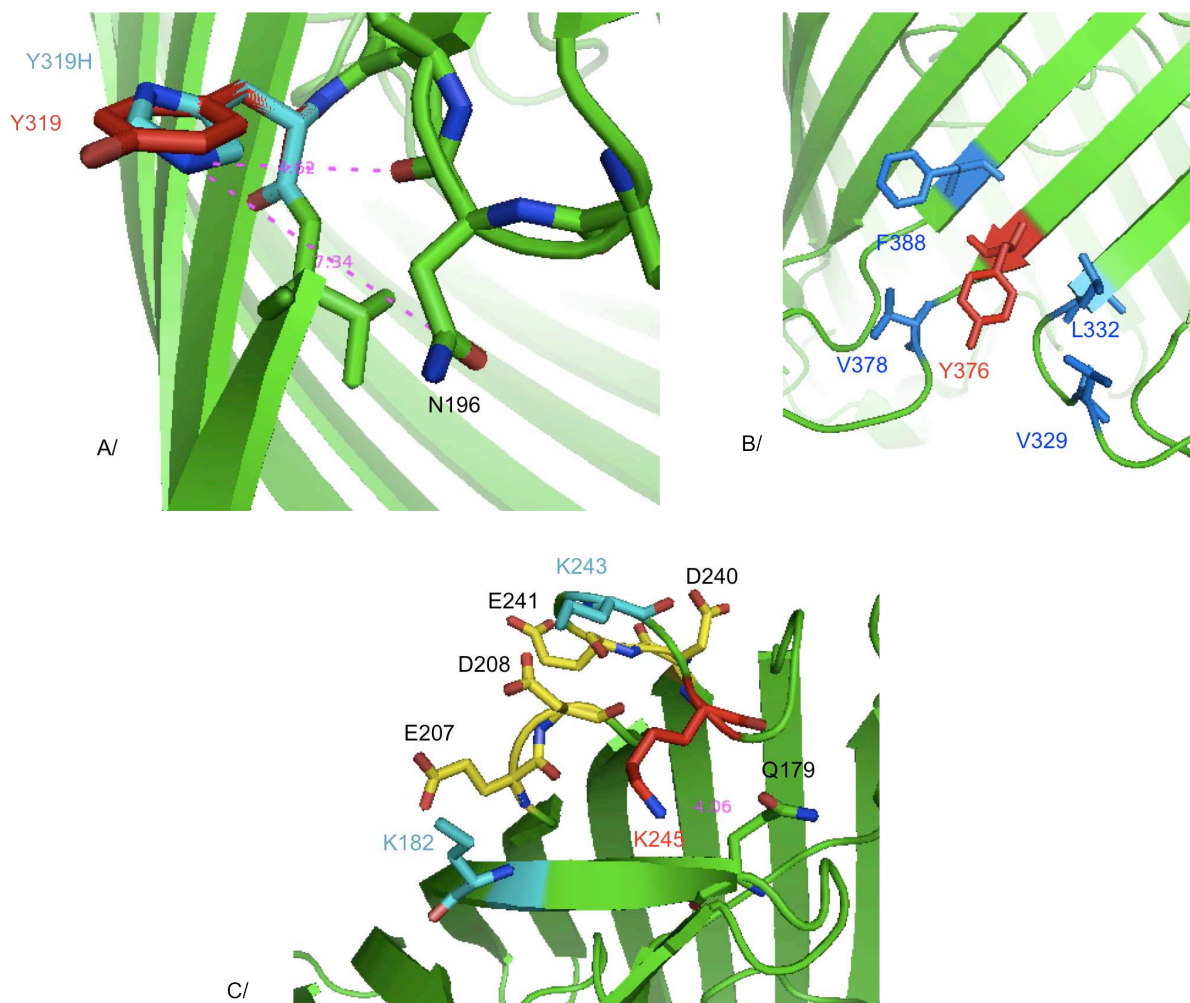


Fig. 93: Zoom de trois régions concernées par des mutations dans OprD de la souche LESB58 de *Pseudomonas aeruginosa*

A/ Visualisation de l'effet possible de la mutation Y219H. Le remplacement de la tyrosine (rouge) par une histidine (cyan) pourrait nécessiter la formation d'une liaison hydrogène pour « masquer » le caractère polaire supplémentaire du nouvel acide aminé dans cette zone membranaire. La liaison hydrogène matérialisée par un trait pointillé rose pourrait faire intervenir le résidu N196 de la boucle voisine après un réarrangement structural local. B/ Visualisation de l'acide aminé Y376 (en rouge) situé au cœur d'un cluster de résidus hydrophobes (représentés en bleu) C/ Visualisation de l'environnement de l'acide aminé K245. Dans la forme sauvage d'OprD, le résidu K245 effectue une liaison électrostatique avec le résidu Q179 voisin (vert). La mutation K245Q diminuera la force de cette liaison sans destabilisation locale majeure de la structure de cette zone comprenant de nombreux résidus polaires (représentés en jaune pour les résidus chargés négativement et en bleu pour les acides aminés basiques).

4.2.2.1.2. Mutants de PAO1 et PA14

La souche Val02 dérivée de la souche PAO1 présente une mutation qui touche un acide aminé localisé sur une boucle de l'extrémité extracellulaire de la porine (Fig. 94). Cette lysine 182 est entourée d'un cluster de trois autres lysines (K207, K243 et K245) et d'un acide aspartique (D231) (Fig. 95). La mutation en glutamine va modifier la charge de cette zone.

La souche 5-17 présente une alanine en position 402 contrairement aux souches PAO1, LESB58 et PA7 mais il s'agit d'une variation liée à la souche PA14, nous ne considérerons donc pas cet acide aminé comme muté. La résistance modérément accrue de cette souche est vraisemblablement liée à un autre mécanisme qu'une modification touchant la porine OprD.

La souche 6-20 de PA14 en revanche présente bien la mutation S380P. L'acide aminé concerné est situé sur l'extérieur d'une boucle périplasmique (Fig. 94). L'apparition d'une proline au niveau de ce résidu est compatible avec les angles dièdres ψ et ϕ de cette zone en feuillet et n'engendrera donc pas de modification structurale importante. Cette mutation va avoir pour effet de réduire la flexibilité de la boucle. Bien qu'elle soit associée à une résistance modérée (facteur 4 par rapport à la souche PA14wt), il est possible que la proline rigidifie la boucle et l'empêche de basculer correctement. La nécessité de ce mouvement paraît d'ailleurs vraisemblable d'après les facteurs d'agitation thermique élevés observés pour cette zone dans la structure cristallographique d'OprD. De plus, comme nous l'évoquons dans le paragraphe précédent, nous devons noter que cette mutation affecte la boucle où se situent deux autres mutations (V378A et Y376N) ayant des effets différents d'un point de vue de la résistance aux carbapénèmes. Nous soulignons donc le rôle fonctionnel que pourrait jouer cette boucle.

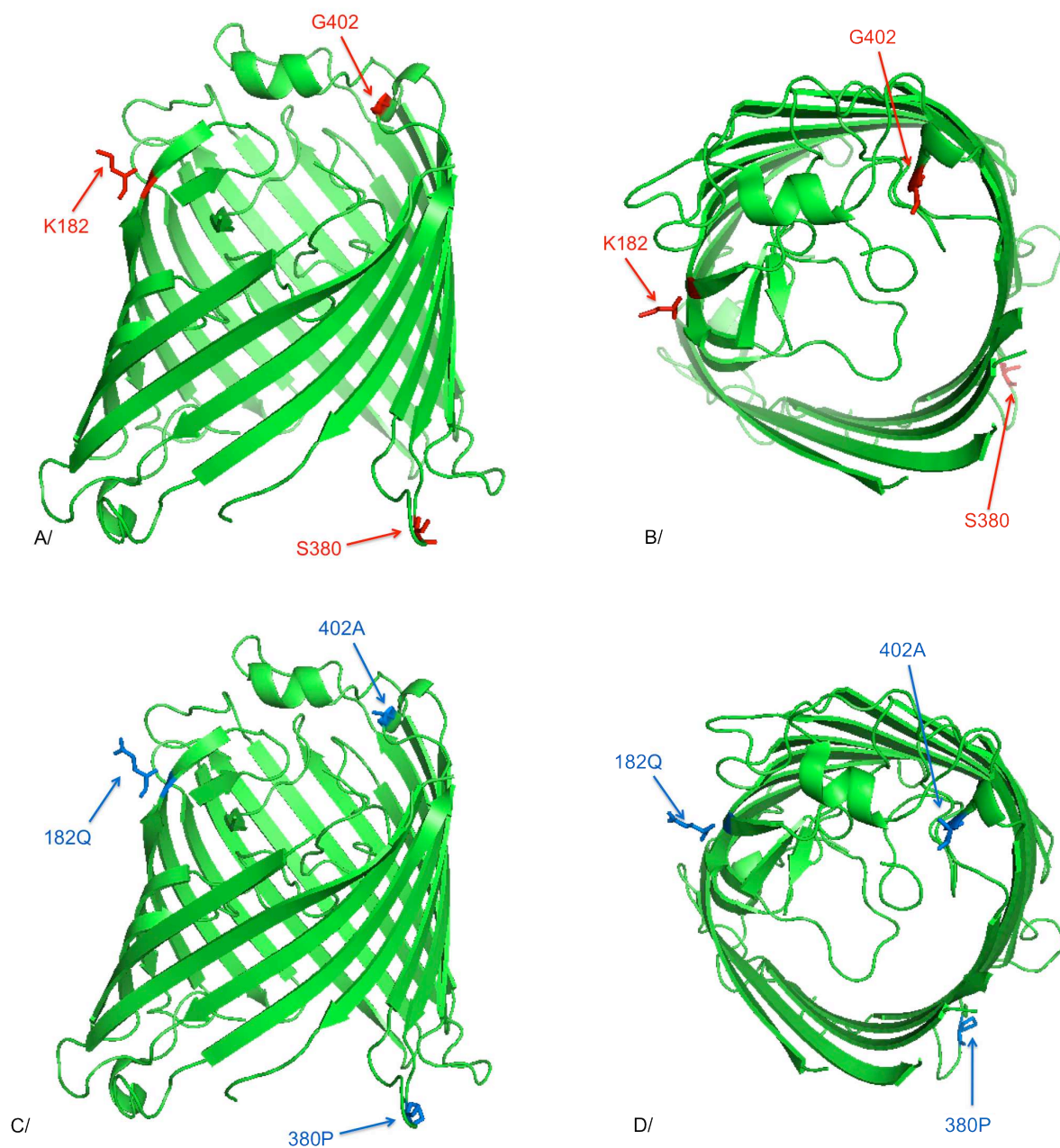


Fig. 94: Localisation des acides aminés mutés dans les souches dérivés de PA14 sur la structure d'OprD

A/ et C/ Vue parallèle à la membrane de la structure d'OprD avant (A/) et après mutation (C/). B/ et D/ Vue par en dessous de la structure d'OprD avant (B/) et après mutation (D/). Les chaînes latérales des acides aminés avant mutation (colorés en rouge) et après mutations (colorés en bleu) sont mises en exergue sur les quatre figures.

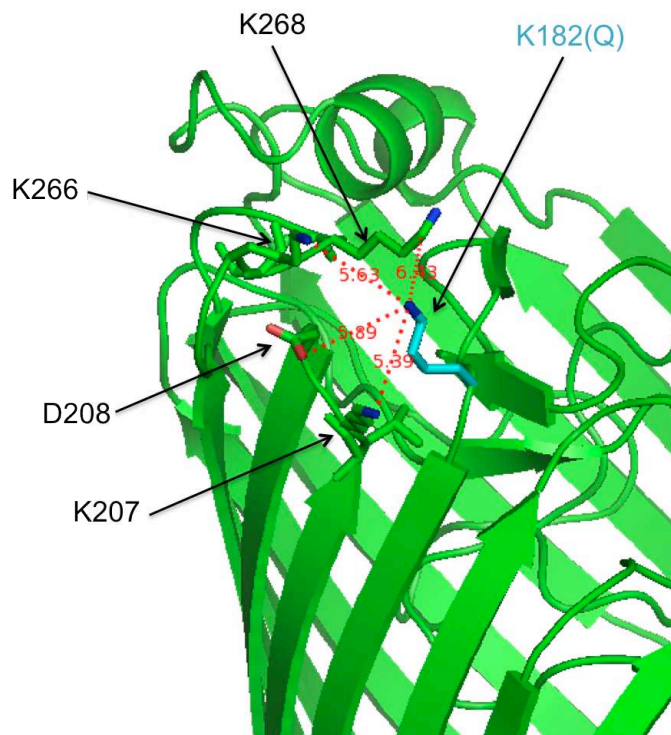


Fig. 95: Zoom de la région concernée par la mutation K182Q d'OprD de la souche PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*

4.2.2.1.3. Mutants mixtes PA14-LESB58

Les souches 6-5, GAR02 et CLI03 présentent entre 5 et 7 mutations que l'on ne retrouve ni dans la souche PA14 ni dans la souche LESB58 dont elles dérivent. Etant donné cette complexité, nous avons procédé par élimination, pour tenter de trouver pour chaque souche quelle mutation pouvait être à l'origine de la résistance accrue à l'imipénème. Tout d'abord, ces souches mixtes font penser à des dérivés de la souche PA7 car PA7 possède les mêmes variations attribuées à PA14 et LESB58 avec, en plus, 4 mutations qui lui sont propres (G37R, S225E, L372F et N407D). De plus, deux mutations décelées dans les trois souches cliniques mixtes correspondent à des acides aminés retrouvés dans la souche PA7 (V104L, L324M). Nous considérerons donc que ces deux mutations ne sont pas responsables de l'augmentation de la résistance observée. Un autre acide aminé, G289, est remplacé par une asparagine chez PA7 et est muté en arginine dans les souches 6-5 et CLI03.

Cet acide aminé est localisé sur la boucle mobile 286-290 située à l'entrée de la porine côté extracellulaire et au cœur de la constriction du pore formé par les résidus 127-130, 295-297, 302-307, 391 et 410 (Fig. 97A). Cette boucle pourrait donc être une candidate pour un rôle fonctionnel majeur. Cependant, sa séquence est très variable entre les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, tant en charge (K, E, non chargés) qu'en liberté conformationnelle (G289N, R287G/E), ce qui suggère que les mutations affectant cette boucle n'auront pas une trop grande importance pour la résistance.

La mutation T253A est commune aux trois souches cliniques et concerne un résidu localisé à l'intérieur du tonneau (Fig. 96). Bien que cet acide aminé forme une liaison hydrogène avec N251 qui va être rompue (Fig. 97B), sa mutation en un résidu plus court n'obstruera pas davantage la porine et nous pouvons donc écarter son implication dans la résistance. Pour la souche 6-5 il ne reste que la délétion de deux paires de bases qui provoque l'apparition d'un codon stop prématuré dans la zone 349-360. La structure de la porine est fortement endommagée par cette mutation qui supprime notamment trois feuillets β (Fig. 96). Ceci explique donc pourquoi la souche 6-5 présente une CMI fortement augmentée vis à vis des carbapénèmes, liée à l'absence de la porine OprD dans la membrane externe.

A présent si l'on regarde les souches GAR02 et CLI03, toutes les deux possèdent une mutation sur les acides aminés S380 et Q401 (S380A et Q401A/E). La sérine se trouve sur une boucle périplasmique (Fig. 96) et bien que sa mutation en proline dans la souche 6-20 de PA14 ait un effet notoire, son remplacement par une alanine ne devrait pas avoir de grande conséquence pour aucune des deux souches. Quant à la glutamine, elle effectue une liaison hydrogène avec le résidu E403, qui va être détruite par la mutation (Fig. 97C). Sa mutation en acide glutamique va faire apparaître une charge négative supplémentaire mais ce changement n'est pas drastique et explique sans doute la résistance modérée de GAR02. En revanche d'un point de vue phénotypique la souche GAR02 présente une CMI 4 à 8 fois inférieure à celle de CLI03 dans laquelle la porine OprD n'est plus visible dans la

membrane. La seule façon d'expliquer cette différence entre les deux souches est la présence d'une mutation supplémentaire sur CLI03 : la mutation H265D. L'histidine est située sur une grande boucle périplasmique (Fig. 96). Sa mutation en acide aspartique va rompre cette liaison et la présence de ce résidu chargé négativement au milieu de résidus aromatiques (Y320, F267 et Y260) dans une zone limitrophe de la membrane (Fig. 97D) peut avoir des conséquences relativement importantes sur la stabilité de la protéine.

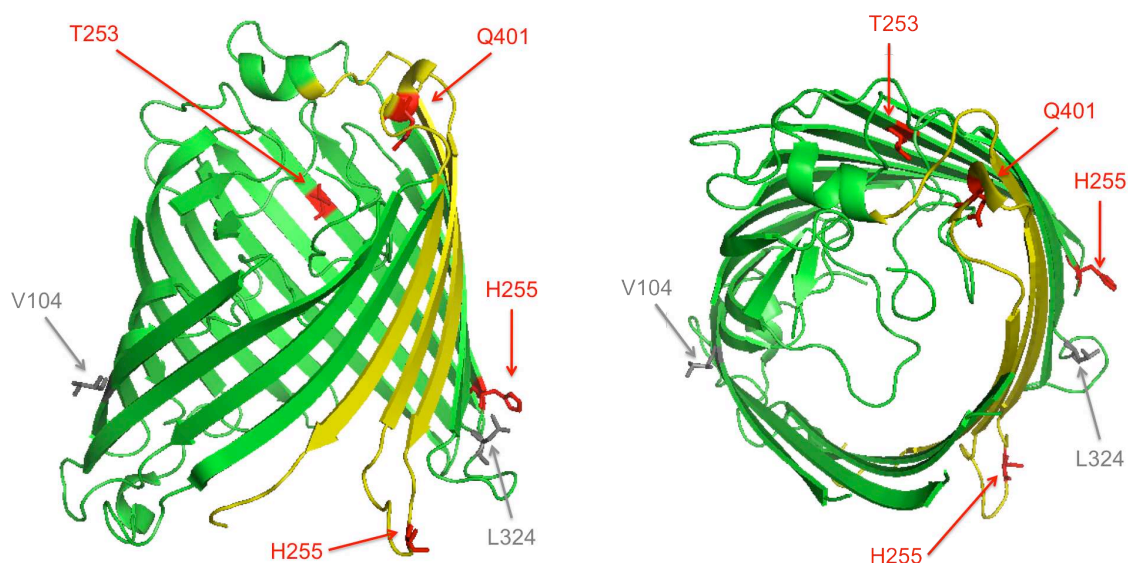


Fig. 96: Localisation des mutations retrouvées dans les souches mixtes dérivées de PA14 et LESB58

A/ Vue parallèle à la membrane de la structure d'OprD. B/ Vue de dessus de la structure d'OprD. Les chaînes latérales des acides aminés mutés sont mises en évidence et colorés en rouge. Les mutations V104L et L324M qui sont des variations de la souche PA7 sont elles, colorées en gris. La partie déléetée suite à l'introduction d'un codon stop dans la souche 6-5 est matérialisée en jaune.

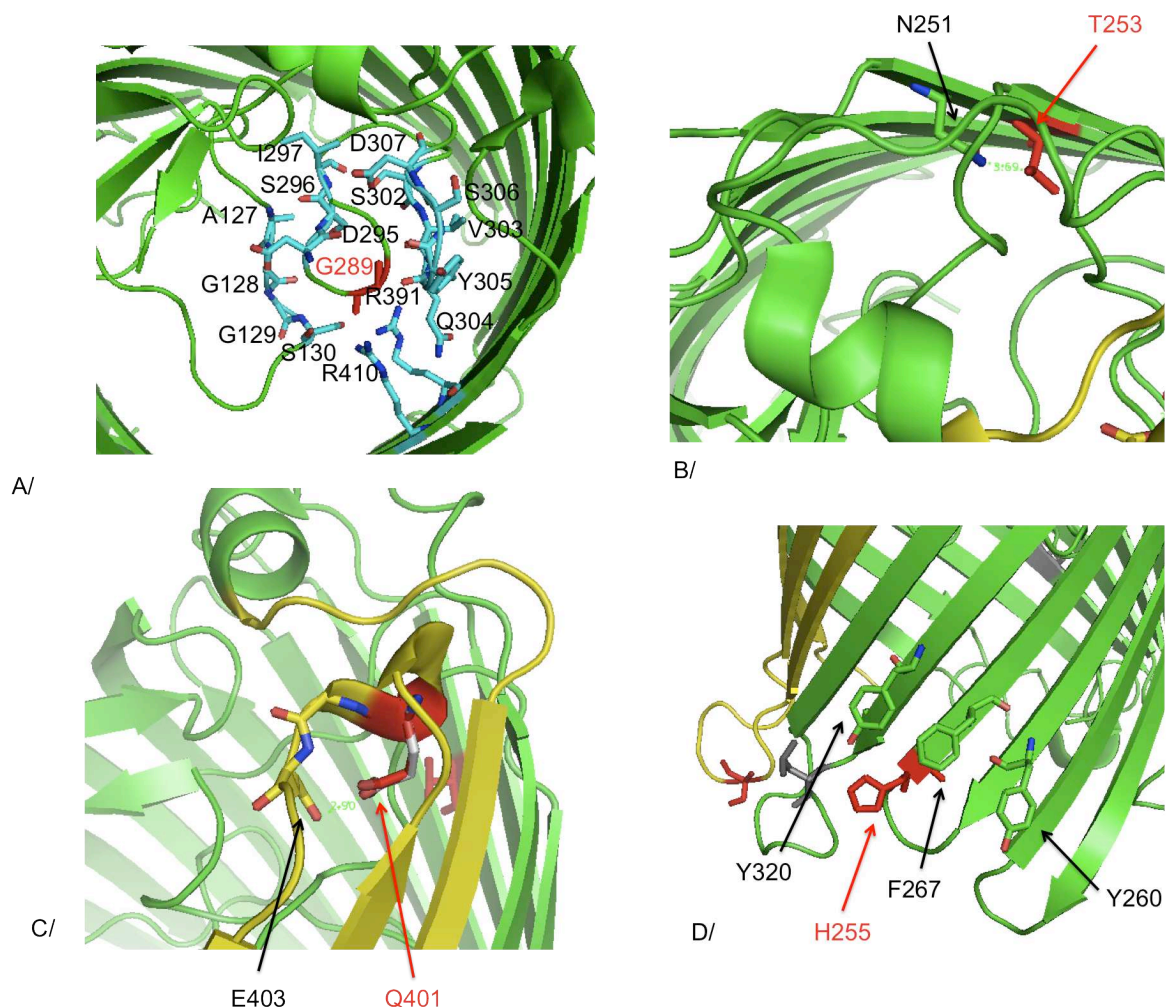


Fig. 97: Zoom sur les résidus G289, T253, Q401 et H255 d'OprD mutés dans des souches cliniques mixtes PA14-LESB58

(A) Le résidu G239 (rouge) est localisé sur une boucle mobile situé au centre de la constriction du pore d'OprD dont les résidus sont représentés en cyan (B/) Le résidu T253 fait une liaison hydrogène avec le résidu N251 voisin. (C/) La liaison hydrogène entre E403 et Q401 va être rompu quand ce dernier est muté en alanine ou acide glutamique. (D/) L'histidine 255 fait partie d'une couronne d'acides aminés aromatiques à la frontière de la membrane externe et du périplasme.

On voit donc au travers de ces deux études de mutants cliniques, qu'on peut proposer une explication des effets phénotypiques de mutations générées par la bactérie pour résister aux traitements thérapeutiques, par la combinaison de techniques de biologie moléculaire (« reverse transcription ») et de biochimie (« Western Blot ») couplées à une analyse structurale.

PARTIE IV:

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'objectif principal de ces travaux de thèse était d'approfondir l'étude de la porine OprM après la résolution de sa structure cristallographique dans notre laboratoire par Gilles Phan. Afin de répondre aux multiples questions qui restaient en suspens concernant son mécanisme d'ouverture ou son interaction avec ses partenaires, nous avons choisi de développer de nouveaux outils biochimiques, biophysiques ou microbiologiques.

Ainsi, le travail important de mise au point de la technique de BN-PAGE nous a permis de préciser la stoechiométrie d'interaction entre OprM et MexA. Ces résultats sont en accord avec les dernières données bibliographiques sur les systèmes TolC-AcrAB, CusCBA ou MtrCDE qui penchent vers un modèle de pompe tripartite sous forme « 3-6-3 » (Janganan, Bavro *et al.* 2011; Xu, Lee *et al.* 2011; Long, Su *et al.* 2012; Xu, Moeller *et al.* 2012). Nous comptons à présent élargir cette étude aux trois composants de la pompe de *Pseudomonas aeruginosa* et utiliser cette technique en routine dans l'équipe dès lors que nous aurons des mutants à caractériser.

En outre, dans le cadre de l'étude de l'assemblage du système d'efflux tripartite et fidèle à notre discipline première, les efforts futurs devront être portés sur la cristallisation des protéines sous forme de complexes binaires ou tertiaires. Des essais de co-cristallisation entre OprM et MexA ont été initiés au cours de cette thèse mais les différents cristaux obtenus se sont révélés correspondre à différents empilements cristallins de la protéine OprM seule. Il faudra donc notamment s'attacher à stabiliser les interactions entre les partenaires et mieux caractériser la formation du complexe avant de réaliser des essais de cristallisation. Une alternative pourra également être d'étudier les complexes par microscopie électronique, c'est d'ailleurs ce que nous nous proposons de faire en collaboration avec l'équipe d'Olivier Lambert de l'UMR 5248 « Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets » à Bordeaux.

D'un point de vue fonctionnel, une large partie de ce travail de thèse, a eu pour objectif de mettre en place au laboratoire la technique de complémentation *in*

vivo, pour évaluer le phénotype de mutants structuraux de la région périplasmique d'OprM. Les résultats obtenus sur les simples et doubles mutants ont d'ores et déjà permis de montrer qu'il existait des effets variables sur la résistance aux antibiotiques selon les acides aminés mutés dans la constriction périplasmique bien que ces mutants ne présentent pas d'hyper-résistance par rapport à la forme sauvage de la protéine. Toutefois, tout récemment nous avons pu caractériser un phénotype d'hyper-résistance préférentielle aux aminoglycosides pour le quadruple mutant R403L-Y404F-D416A-R419A pour lequel les trois liaisons assurant la constriction périplasmique d'OprM ont été rompues simultanément. Des expériences complémentaires sont à présent nécessaires pour confirmer et tenter d'expliquer ce phénotype surprenant. Ceci ouvre la perspective d'étudier l'interaction de ce mutant avec les partenaires des deux pompes MexAB et MexXY ainsi qu'avec les aminoglycosides par des techniques telles que l'ITC ou le Biacore. Il serait ainsi possible d'évaluer s'il n'existe pas une sélectivité des substrats à un niveau de la pompe autre que via le transporteur RND comme cela a toujours été décrit dans la littérature.

Afin d'élargir les aspects fonctionnels, nous avons débuté une collaboration avec l'équipe de Bruno Lepioufle de l'ENS Cachan afin d'étudier le canal formé par OprM, par des techniques d'électrophysiologie. Les résultats prometteurs obtenus sur ce nouveau système biomimétique miniaturisé nous ont permis d'établir une conductance de 1250pS au sein d'OprM. Cette valeur est compatible avec les données bibliographiques obtenues sur d'autres systèmes d'enregistrement pour son homologue chez *E. coli*. Toutefois, afin de préciser rigoureusement d'éventuelles différences fonctionnelles ou structurales entre ces deux porines OMF, nous envisageons d'étudier le comportement de TolC dans les conditions expérimentales identiques à celle d'OprM. Nous poursuivrons cette étude par la caractérisation électrophysiologique de chaque mutant d'OprM, ce qui nous permettra d'avoir une idée plus précise de leur niveau d'ouverture. Ceci sera évidemment à comparer aux mutants de TolC (Y362F-R637S), faisant appel à un réseau différent de liaisons au niveau de la constriction périplasmique et pour lesquels des variations importantes de conductance ont pu être observées (Pei, Hinchliffe *et al.* 2011).

Ces résultats seront bien sûr à combiner avec la résolution de la structure cristallographique des mutants d'OprM qui offrira une caractérisation à l'échelle atomique des changements conformationnels nécessaires à l'ouverture de la porine.

Par ailleurs, nous travaillons déjà dans l'équipe, dirigée par Isabelle Broutin, sur l'optimisation de ce système microfluidique afin de reconstituer la pompe entière MexAB-OprM *in vitro* (Verchere, Broutin *et al.* 2012). Nous espérons ainsi dégager de nouvelles informations concernant l'interaction entre les trois partenaires puis utiliser ce système à des fins de criblage de nouveaux inhibiteurs.

Enfin, pour élargir le sujet et afin de mieux comprendre la divergence phylogénétique entre OprM et TolC, une étude sur la fonctionnalité d'OprM avec le système HlyABDC pourra être envisagée très prochainement. En effet, TolC est décrite comme étant une protéine multi-fonctionnelle capable de fonctionner aussi bien avec des systèmes d'efflux de type RND tels que AcrAB pour la sécrétion d'antibiotiques qu'avec des transporteurs de type ABC tels que HlyBD pour la sécrétion de l'hémolysine A (Andersen 2003). Bien qu'il soit acquis qu'OprM et TolC proviennent de la duplication d'un gène ancestral commun, aucun système similaire à HlyABDC n'a été décrit chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il serait donc intéressant de regarder si OprM est capable de fonctionner avec ce système et, si ce n'était pas le cas, de rechercher des mutants « gain de fonction » pour la sécrétion de l'hémolysine A. Nous aurons ainsi une nouvelle carte des résidus de l'extrémité périplasmique de la porine qui assurent une spécificité d'interaction avec ses partenaires. D'un point de vue expérimental nous possédons dès à présent tous les outils nécessaires à la réalisation de ces expériences de plaque de lyse. En effet, nous avons fait l'acquisition au cours de cette thèse d'une souche d'*E. coli* délétée de TolC et de la souche sauvage correspondante, nous disposons par l'intermédiaire du Dr Houssain Benabdelhak d'un plasmide pPSG116 porteur du système HlyABDC, du plasmide pME6001 porteur d'OprM et d'un plasmide pBAD-TolC comme contrôle positif, le tout avec des systèmes d'induction et de gènes de résistance compatibles.

Finalement, tous ces travaux ont un même but : élargir les connaissances structurales et fonctionnelles des pompes d'efflux dans l'objectif ultime de pouvoir concevoir des inhibiteurs de ces systèmes tripartites. En effet, une alternative au blocage du site de liaison des substrats du transporteur pourrait être de développer une molécule capable de compromettre l'assemblage des partenaires ou encore de bloquer irréversiblement le canal de la porine.

BIBLIOGRAPHIE

- Aaron, S. D., W. Ferris, et al. (2002). "Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **40**(11): 4172-4179.
- Adam, E. C., B. S. Mitchell, et al. (1997). "Pseudomonas aeruginosa II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose." *Am J Respir Crit Care Med* **155**(6): 2102-2104.
- Adams, R., C. L. Worth, et al. (2012). "Binding sites in membrane proteins - diversity, druggability and prospects." *Eur J Cell Biol* **91**(4): 326-339.
- Adewoye, L., A. Sutherland, et al. (2002). "The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity." *J Bacteriol* **184**(15): 4308-4312.
- Aires, J. R., T. Kohler, et al. (1999). "Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(11): 2624-2628.
- Akama, H., M. Kanemaki, et al. (2004). "Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end." *J Biol Chem* **279**(51): 52816-52819.
- Akama, H., T. Matsuura, et al. (2004). "Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* **279**(25): 25939-25942.
- Akasaka, T., M. Tanaka, et al. (2001). "Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(8): 2263-2268.
- Alguel, Y., D. Lu, et al. (2010). "Crystal structure of MexZ, a key repressor responsible for antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Struct Biol* **172**(3): 305-310.
- Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**(1036): 321-331.
- Andersen, C. (2003). "Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **147**: 122-165.
- Andersen, C., C. Hughes, et al. (2002). "Electrophysiological behavior of the TolC channel-tunnel in planar lipid bilayers." *J Membr Biol* **185**(1): 83-92.
- Andersen, C., E. Koronakis, et al. (2002). "Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11103-11108.
- Andersen, C., E. Koronakis, et al. (2002). "An aspartate ring at the TolC tunnel entrance determines ion selectivity and presents a target for blocking by large cations." *Mol Microbiol* **44**(5): 1131-1139.
- Baba, T., T. Ara, et al. (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." *Mol Syst Biol* **2**: 2006 0008.
- Bagge, N., O. Ciofu, et al. (2002). "Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(11): 3406-3411.
- Barrow, K. and D. H. Kwon (2009). "Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(12): 5150-5154.
- Bavro, V. N., Z. Pietras, et al. (2008). "Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine." *Mol Cell* **30**(1): 114-121.

- Bell, A., M. Bains, et al. (1991). "Pseudomonas aeruginosa outer membrane protein OprH: expression from the cloned gene and function in EDTA and gentamicin resistance." J Bacteriol **173**(21): 6657-6664.
- Bellido, F., C. Veuthey, et al. (1990). "Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate." J Antimicrob Chemother **25**(1): 57-68.
- Berry, E. A., L. S. Huang, et al. (1991). "Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase of higher plants. Isolation and characterization of the bc1 complex from potato tuber mitochondria." J Biol Chem **266**(14): 9064-9077.
- Bert, F., C. Branger, et al. (2002). "Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa using PCR-restriction fragment length polymorphism." J Antimicrob Chemother **50**(1): 11-18.
- Biswas, S., M. M. Mohammad, et al. (2007). "Structural insight into OprD substrate specificity." Nat Struct Mol Biol **14**(11): 1108-1109.
- Blumer, C., S. Heeb, et al. (1999). "Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in Pseudomonas fluorescens involves specific ribosome binding sites." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 14073-14078.
- Boissinot, M. and R. C. Levesque (1990). "Nucleotide sequence of the PSE-4 carbenicillinase gene and correlations with the Staphylococcus aureus PC1 beta-lactamase crystal structure." J Biol Chem **265**(2): 1225-1230.
- Bokma, E., E. Koronakis, et al. (2006). "Directed evolution of a bacterial efflux pump: adaptation of the E. coli TolC exit duct to the Pseudomonas MexAB translocase." FEBS Lett **580**(22): 5339-5343.
- Borgianni, L., S. Prandi, et al. (2011). "Genetic context and biochemical characterization of the IMP-18 metallo-beta-lactamase identified in a Pseudomonas aeruginosa isolate from the United States." Antimicrob Agents Chemother **55**(1): 140-145.
- Bradford, P. A. (2001). "What's New in beta-lactamases?" Curr Infect Dis Rep **3**(1): 13-19.
- Bryan, L. E., K. O'Hara, et al. (1984). "Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa." Antimicrob Agents Chemother **26**(2): 250-255.
- Cao, L., R. Srikumar, et al. (2004). "MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719." Mol Microbiol **53**(5): 1423-1436.
- Castanheira, M., M. A. Toleman, et al. (2004). "Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase." Antimicrob Agents Chemother **48**(12): 4654-4661.
- Cavallo, J. D., F. Leblanc, et al. (2000). "[Surveillance of Pseudomonas aeruginosa sensitivity to antibiotics in France and distribution of beta-lactam resistance mechanisms: 1998 GERPB study]." Pathol Biol (Paris) **48**(5): 472-477.
- Chemani, C., A. Imberty, et al. (2009). "Role of LecA and LecB lectins in Pseudomonas aeruginosa-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands." Infect Immun **77**(5): 2065-2075.
- Chevalier, J., S. Atifi, et al. (2001). "New pyridoquinoline derivatives as potential inhibitors of the fluoroquinolone efflux pump in resistant Enterobacter aerogenes strains." J Med Chem **44**(23): 4023-4026.
- Chevalier, J., J. Bredin, et al. (2004). "Inhibitors of antibiotic efflux in resistant Enterobacter aerogenes and Klebsiella pneumoniae strains." Antimicrob Agents Chemother **48**(3): 1043-1046.
- Chevalier, J., A. Mahamoud, et al. (2010). "Quinazoline derivatives are efficient chemosensitizers of antibiotic activity in Enterobacter aerogenes, Klebsiella

- pneumoniae and *Pseudomonas aeruginosa* resistant strains." *Int J Antimicrob Agents* **36**(2): 164-168.
- Coyne, S., P. Courvalin, et al. (2010). "Acquisition of multidrug resistance transposon Tn6061 and IS6100-mediated large chromosomal inversions in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates." *Microbiology* **156**(Pt 5): 1448-1458.
- Crameri, A., E. A. Whitehorn, et al. (1996). "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling." *Nat Biotechnol* **14**(3): 315-319.
- Cryz, S. J., Jr., T. L. Pitt, et al. (1984). "Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." *Infect Immun* **44**(2): 508-513.
- Daigle, D. M., L. Cao, et al. (2007). "Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **189**(15): 5441-5451.
- Daniels, C., A. Daddaoua, et al. (2010). "Domain cross-talk during effector binding to the multidrug binding TTGR regulator." *J Biol Chem* **285**(28): 21372-21381.
- Das, D., Q. S. Xu, et al. (2007). "Crystal structure of the multidrug efflux transporter AcrB at 3.1 Å resolution reveals the N-terminal region with conserved amino acids." *J Struct Biol* **158**(3): 494-502.
- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6640-6645.
- De Angelis, F., J. K. Lee, et al. (2010). "Metal-induced conformational changes in ZneB suggest an active role of membrane fusion proteins in efflux resistance systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(24): 11038-11043.
- De Champs, C., C. Chanal, et al. (2004). "Frequency and diversity of Class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study." *J Antimicrob Chemother* **54**(3): 634-639.
- de Kievit, T. R. and B. H. Iglewski (2000). "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships." *Infect Immun* **68**(9): 4839-4849.
- Demarche, S., K. Sugihara, et al. (2011). "Techniques for recording reconstituted ion channels." *Analyst* **136**(6): 1077-1089.
- Doi, Y. and Y. Arakawa (2007). "16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides." *Clin Infect Dis* **45**(1): 88-94.
- Doi, Y., D. de Oliveira Garcia, et al. (2007). "Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(3): 852-856.
- Dubern, J. F. and S. P. Diggle (2008). "Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species." *Mol Biosyst* **4**(9): 882-888.
- Dubois, V., C. Arpin, et al. (2002). "Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(11): 3624-3626.
- Elkins, C. A. and H. Nikaido (2003). "Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its C-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump." *J Bacteriol* **185**(18): 5349-5356.
- Elliott, D., J. L. Burns, et al. (2010). "Exploratory study of the prevalence and clinical significance of tobramycin-mediated biofilm induction in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(7): 3024-3026.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.
- Eren, E., J. Vijayaraghavan, et al. (2012). "Substrate specificity within a family of outer membrane carboxylate channels." *PLoS Biol* **10**(1): e1001242.

- Ernst, R. K., E. C. Yi, et al. (1999). "Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*." *Science* **286**(5444): 1561-1565.
- Eswaran, J., C. Hughes, et al. (2003). "Locking TolC entrance helices to prevent protein translocation by the bacterial type I export apparatus." *J Mol Biol* **327**(2): 309-315.
- Evans, D. J., G. B. Pier, et al. (1994). "The *rfb* locus from *Pseudomonas aeruginosa* strain PA103 promotes the expression of O antigen by both LPS-rough and LPS-smooth isolates from cystic fibrosis patients." *Mol Microbiol* **13**(3): 427-434.
- Falagas, M. E. and S. K. Kasiakou (2005). "Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections." *Clin Infect Dis* **40**(9): 1333-1341.
- Federici, L., D. Du, et al. (2005). "The crystal structure of the outer membrane protein VceC from the bacterial pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 Å resolution." *J Biol Chem* **280**(15): 15307-15314.
- Feldman, M., R. Bryan, et al. (1998). "Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection." *Infect Immun* **66**(1): 43-51.
- Fernandez, L., W. J. Gooderham, et al. (2010). "Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(8): 3372-3382.
- Fernandez-Recio, J., F. Walas, et al. (2004). "A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria." *FEBS Lett* **578**(1-2): 5-9.
- Ferrandez, Y., L. Monlezun, et al. (2012). "Stoichiometry of the MexA-OprM binding, as investigated by blue native gel electrophoresis." *Electrophoresis* **33**(8): 1282-1287.
- Fertig, N., M. George, et al. (2003). "Microstructured apertures in planar glass substrates for ion channel research." *Receptors Channels* **9**(1): 29-40.
- Filip, C., G. Fletcher, et al. (1973). "Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate." *J Bacteriol* **115**(3): 717-722.
- Galloway, D. R. (1991). "*Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments." *Mol Microbiol* **5**(10): 2315-2321.
- Ghosh, S., C. M. Cremers, et al. (2011). "Chlorinated phenols control the expression of the multidrug resistance efflux pump MexAB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* by interacting with NalC." *Mol Microbiol* **79**(6): 1547-1556.
- Girlich, D., T. Naas, et al. (2004). "Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2043-2048.
- Giske, C. G., B. Libisch, et al. (2006). "Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing." *J Clin Microbiol* **44**(12): 4309-4315.
- Gotoh, N., H. Tsujimoto, et al. (1998). "Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in DeltamexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(8): 1938-1943.
- Guilloteau, J. P., N. Fromage, et al. (1996). "Purification, stabilization, and crystallization of a modular protein: Grb2." *Proteins* **25**(1): 112-119.
- Gunn, J. S., K. B. Lim, et al. (1998). "PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance." *Mol Microbiol* **27**(6): 1171-1182.

- Guzman, L. M., D. Belin, et al. (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." *J Bacteriol* **177**(14): 4121-4130.
- Guzzo, J., J. M. Pages, et al. (1991). "Pseudomonas aeruginosa alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism." *J Bacteriol* **173**(17): 5290-5297.
- Hachler, H., P. Santanam, et al. (1996). "Sequence and characterization of a novel chromosomal aminoglycoside phosphotransferase gene, aph (3')-IIb, in Pseudomonas aeruginosa." *Antimicrob Agents Chemother* **40**(5): 1254-1256.
- Hainrichson, M., O. Yaniv, et al. (2007). "Overexpression and initial characterization of the chromosomal aminoglycoside 3'-O-phosphotransferase APH(3')-IIb from Pseudomonas aeruginosa." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2): 774-776.
- Hall, B. G. and M. Barlow (2005). "Revised Ambler classification of {beta}-lactamases." *J Antimicrob Chemother* **55**(6): 1050-1051.
- Hancock, R. E., G. M. Decad, et al. (1979). "Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa PA01." *Biochim Biophys Acta* **554**(2): 323-331.
- Hancock, R. E., L. M. Mutharia, et al. (1983). "Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains." *Infect Immun* **42**(1): 170-177.
- Hanson, N. D., A. Hossain, et al. (2006). "First occurrence of a Pseudomonas aeruginosa isolate in the United States producing an IMP metallo-beta-lactamase, IMP-18." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(6): 2272-2273.
- Heuberger, E. H., L. M. Veenhoff, et al. (2002). "Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation." *J Mol Biol* **317**(4): 591-600.
- Higgins, M. K., E. Bokma, et al. (2004). "Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 9994-9999.
- Higgins, M. K., J. Eswaran, et al. (2004). "Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC." *J Mol Biol* **342**(3): 697-702.
- Higgins, P. G., A. C. Fluit, et al. (2003). "Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa." *Int J Antimicrob Agents* **21**(5): 409-413.
- Hocquet, D., P. Berthelot, et al. (2007). "Pseudomonas aeruginosa may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(10): 3531-3536.
- Hocquet, D., P. Plesiat, et al. (2010). "Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant Pseudomonas aeruginosa strains in France." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(8): 3512-3515.
- Hoffman, L. R., D. A. D'Argenio, et al. (2005). "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation." *Nature* **436**(7054): 1171-1175.
- Hong, Y. Q. and B. Ghebrehwet (1992). "Effect of Pseudomonas aeruginosa elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3." *Clin Immunol Immunopathol* **62**(2): 133-138.
- Huovinen, P. and G. A. Jacoby (1991). "Sequence of the PSE-1 beta-lactamase gene." *Antimicrob Agents Chemother* **35**(11): 2428-2430.
- Husain, F., M. Humbard, et al. (2004). "Interaction between the TolC and AcrA proteins of a multidrug efflux system of Escherichia coli." *J Bacteriol* **186**(24): 8533-8536.
- Husain, F. and H. Nikaido (2010). "Substrate path in the AcrB multidrug efflux pump of Escherichia coli." *Mol Microbiol* **78**(2): 320-330.

- Ide, T., Y. Takeuchi, et al. (2002). "Simultaneous optical and electrical recording of a single ion-channel." *Jpn J Physiol* **52**(5): 429-434.
- Ide, T. and T. Yanagida (1999). "An artificial lipid bilayer formed on an agarose-coated glass for simultaneous electrical and optical measurement of single ion channels." *Biochem Biophys Res Commun* **265**(2): 595-599.
- Imberty, A., M. wimmerova, et al. (2004). "Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition." *Microbes Infect* **6**(2): 221-228.
- Ip, H., K. Stratton, et al. (2003). "pH-induced conformational changes of AcrA, the membrane fusion protein of *Escherichia coli* multidrug efflux system." *J Biol Chem* **278**(50): 50474-50482.
- Islam, S., H. Oh, et al. (2009). "Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients." *Clin Microbiol Infect* **15**(1): 60-66.
- Iyer, R., Z. Wu, et al. (2000). "Molecular basis for the polyamine-ompF porin interactions: inhibitor and mutant studies." *J Mol Biol* **297**(4): 933-945.
- Jacobs, C., B. Joris, et al. (1995). "AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase." *Mol Microbiol* **15**(3): 553-559.
- Jacoby, G. A. (2005). "Mechanisms of resistance to quinolones." *Clin Infect Dis* **41 Suppl 2**: S120-126.
- Jacoby, G. A. and K. Bush (2005). "Beta-lactamase nomenclature." *J Clin Microbiol* **43**(12): 6220.
- Jalal, S., O. Ciofu, et al. (2000). "Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(3): 710-712.
- Janganan, T. K., V. N. Bavro, et al. (2011). "Evidence for the assembly of a bacterial tripartite multidrug pump with a stoichiometry of 3:6:3." *J Biol Chem* **286**(30): 26900-26912.
- Jeannot, K., M. L. Sobel, et al. (2005). "Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction." *J Bacteriol* **187**(15): 5341-5346.
- Jensen, T., S. S. Pedersen, et al. (1987). "Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection." *J Antimicrob Chemother* **19**(6): 831-838.
- Johansen, H. K., S. M. Moskowitz, et al. (2008). "Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients." *J Cyst Fibros* **7**(5): 391-397.
- Johnson, T. D. (1996). "Modulation of channel function by polyamines." *Trends Pharmacol Sci* **17**(1): 22-27.
- Katz, A., P. Waridel, et al. (2007). "Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and nano-LC-MS/MS analysis." *Mol Cell Proteomics* **6**(9): 1459-1472.
- Kawabe, T., E. Fujihira, et al. (2000). "Molecular construction of a multidrug exporter system, AcrAB: molecular interaction between AcrA and AcrB, and cleavage of the N-terminal signal sequence of AcrA." *J Biochem* **128**(2): 195-200.
- Kawano, R., T. Osaki, et al. (2010). "A polymer-based nanopore-integrated microfluidic device for generating stable bilayer lipid membranes." *Small* **6**(19): 2100-2104.
- Kettner, M., P. Milosovic, et al. (1995). "Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates." *Infection* **23**(6): 380-383.

- Khan, W., S. P. Bernier, et al. (2010). "Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide." *Int Microbiol* **13**(4): 207-212.
- Khodursky, A. B. and N. R. Cozzarelli (1998). "The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials." *J Biol Chem* **273**(42): 27668-27677.
- Kim, H. M., Y. Xu, et al. (2010). "Functional relationships between the AcrA hairpin tip region and the TolC aperture tip region for the formation of the bacterial tripartite efflux pump AcrAB-TolC." *J Bacteriol* **192**(17): 4498-4503.
- Koh, T. H., G. C. Wang, et al. (2004). "IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2334-2336.
- Kohler, T., L. K. Curty, et al. (2000). "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili." *J Bacteriol* **182**(21): 5990-5996.
- Kohler, T., S. F. Epp, et al. (1999). "Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **181**(20): 6300-6305.
- Kohler, T., M. Kok, et al. (1996). "Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **40**(10): 2288-2290.
- Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, et al. (1997). "Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol Microbiol* **23**(2): 345-354.
- Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, et al. (1997). "Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(11): 2540-2543.
- Kohler, T., C. van Delden, et al. (2001). "Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **183**(18): 5213-5222.
- Koike, M., K. Iida, et al. (1969). "Electron microscopic studies on mode of action of polymyxin." *J Bacteriol* **97**(1): 448-452.
- Kong, K. F., S. R. Jayawardena, et al. (2005). "Characterization of poxB, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase." *Gene* **358**: 82-92.
- Kong, K. F., S. R. Jayawardena, et al. (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(11): 4567-4575.
- Koronakis, V., A. Sharff, et al. (2000). "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export." *Nature* **405**(6789): 914-919.
- Krishnamoorthy, G., E. B. Tikhonova, et al. (2008). "Fitting periplasmic membrane fusion proteins to inner membrane transporters: mutations that enable *Escherichia coli* AcrA to function with *Pseudomonas aeruginosa* MexB." *J Bacteriol* **190**(2): 691-698.
- Kwon, D. H. and C. D. Lu (2006). "Polyamines increase antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(5): 1623-1627.
- Kwon, D. H. and C. D. Lu (2006). "Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(5): 1615-1622.
- Kwon, D. H. and C. D. Lu (2007). "Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(6): 2070-2077.
- Lachapelle, J., J. Dufresne, et al. (1991). "Characterization of the blaCARB-3 gene encoding the carbenicillinase-3 beta-lactamase of *Pseudomonas aeruginosa*." *Gene* **102**(1): 7-12.

- Lamont, I. L., P. A. Beare, et al. (2002). "Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 7072-7077.
- Langae, T. Y., L. Gagnon, et al. (2000). "Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression." Antimicrob Agents Chemother **44**(3): 583-589.
- Lasserre, J. P., E. Beyne, et al. (2006). "A complexomic study of *Escherichia coli* using two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis." Electrophoresis **27**(16): 3306-3321.
- Le Berre, R., K. Faure, et al. (2006). "[Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*?]." Med Mal Infect **36**(7): 349-357.
- Le Pioufle, B., H. Suzuki, et al. (2008). "Lipid bilayer microarray for parallel recording of transmembrane ion currents." Anal Chem **80**(1): 328-332.
- Le, T. B., M. A. Schumacher, et al. (2011). "The crystal structure of the TetR family transcriptional repressor SimR bound to DNA and the role of a flexible N-terminal extension in minor groove binding." Nucleic Acids Res **39**(21): 9433-9447.
- Le Thomas, I., G. Couetdic, et al. (2001). "In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy." J Antimicrob Chemother **48**(4): 553-555.
- Lee, J. K., Y. S. Lee, et al. (2005). "Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." Int J Antimicrob Agents **25**(4): 290-295.
- Lehmann-Horn, F. and K. Jurkat-Rott (1999). "Voltage-gated ion channels and hereditary disease." Physiol Rev **79**(4): 1317-1372.
- Li, X. Z., H. Nikaido, et al. (1995). "Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **39**(9): 1948-1953.
- Lindquist, S., K. Weston-Hafer, et al. (1993). "AmpG, a signal transducer in chromosomal beta-lactamase induction." Mol Microbiol **9**(4): 703-715.
- Lister, P. D., D. J. Wolter, et al. (2009). "Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms." Clin Microbiol Rev **22**(4): 582-610.
- Livermore, D. M. (1987). "Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods." Eur J Clin Microbiol **6**(4): 439-445.
- Livermore, D. M. (1995). "beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." Clin Microbiol Rev **8**(4): 557-584.
- Llanes, C., D. Hocquet, et al. (2004). "Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously." Antimicrob Agents Chemother **48**(5): 1797-1802.
- Lobedanz, S., E. Bokma, et al. (2007). "A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(11): 4612-4617.
- Lomovskaya, O. and K. A. Bostian (2006). "Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use." Biochem Pharmacol **71**(7): 910-918.
- Lomovskaya, O., M. S. Warren, et al. (2001). "Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy." Antimicrob Agents Chemother **45**(1): 105-116.
- Long, F., C. C. Su, et al. (2012). "Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1592): 1047-1058.

- Ludi, H. and W. Hasselbach (1985). "Preparation of a highly concentrated, completely monomeric, active sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." *Biochim Biophys Acta* **821**(1): 137-141.
- Macfarlane, E. L., A. Kwasnicka, et al. (1999). "PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance." *Mol Microbiol* **34**(2): 305-316.
- Mallea, M., A. Mahamoud, et al. (2003). "Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates." *Biochem J* **376**(Pt 3): 801-805.
- Malloy, J. L., R. A. Veldhuizen, et al. (2005). "Pseudomonas aeruginosa protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(2): L409-418.
- Mao, W., M. S. Warren, et al. (2002). "On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition." *Mol Microbiol* **46**(3): 889-901.
- Marchandin, H., H. Jean-Pierre, et al. (2000). "Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(1): 213-216.
- Maseda, H., K. Saito, et al. (2000). "Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiol Lett* **192**(1): 107-112.
- Maseda, H., H. Yoneyama, et al. (2000). "Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(3): 658-664.
- Masuda, N., E. Sakagawa, et al. (2000). "Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(12): 3322-3327.
- Matsuo, Y., S. Eda, et al. (2004). "MexZ-mediated regulation of mexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the mexZ-mexX intergenic DNA." *FEMS Microbiol Lett* **238**(1): 23-28.
- McPhee, J. B., S. Lewenza, et al. (2003). "Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol Microbiol* **50**(1): 205-217.
- Meyer, J. M., A. Neely, et al. (1996). "Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." *Infect Immun* **64**(2): 518-523.
- Middlemiss, J. K. and K. Poole (2004). "Differential impact of MexB mutations on substrate selectivity of the MexAB-OprM multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **186**(5): 1258-1269.
- Mikolosko, J., K. Bobyk, et al. (2006). "Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA." *Structure* **14**(3): 577-587.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Y. Glupczynski, et al. (1999). "Aminoglycosides: activity and resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(4): 727-737.
- Miroux, B. and J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." *J Mol Biol* **260**(3): 289-298.
- Misra, R. and V. N. Bavro (2009). "Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems." *Biochim Biophys Acta* **1794**(5): 817-825.

- Mokhonov, V. V., E. I. Mokhonova, et al. (2004). "Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochem Biophys Res Commun* **322**(2): 483-489.
- Montal, M. and P. Mueller (1972). "Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(12): 3561-3566.
- Morita, Y., L. Cao, et al. (2006). "nalD encodes a second repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **188**(24): 8649-8654.
- Morita, Y., T. Murata, et al. (2003). "Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *J Antimicrob Chemother* **51**(4): 991-994.
- Morita, Y., M. L. Sobel, et al. (2006). "Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product." *J Bacteriol* **188**(5): 1847-1855.
- Moskowitz, S. M., R. K. Ernst, et al. (2004). "PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A." *J Bacteriol* **186**(2): 575-579.
- Mueller, P., D. O. Rudin, et al. (1962). "Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system." *Nature* **194**: 979-980.
- Mugnier, P., P. Dubrous, et al. (1996). "A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **40**(11): 2488-2493.
- Muller, C., P. Plesiat, et al. (2011). "A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(3): 1211-1221.
- Murakami, S., R. Nakashima, et al. (2006). "Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism." *Nature* **443**(7108): 173-179.
- Murakami, S., R. Nakashima, et al. (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." *Nature* **419**(6907): 587-593.
- Muramatsu, H., T. Horii, et al. (2005). "Characterization of fluoroquinolone and carbapenem susceptibilities in clinical isolates of levofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*." *Chemotherapy* **51**(2-3): 70-75.
- Nehme, D., X. Z. Li, et al. (2004). "Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in mexA compromising MexA multimerization and interaction with MexB." *J Bacteriol* **186**(10): 2973-2983.
- Nehme, D. and K. Poole (2005). "Interaction of the MexA and MexB components of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexA extragenic suppressors of a T578I mutation in MexB." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(10): 4375-4378.
- Nehme, D. and K. Poole (2007). "Assembly of the MexAB-OprM multidrug pump of *Pseudomonas aeruginosa*: component interactions defined by the study of pump mutant suppressors." *J Bacteriol* **189**(17): 6118-6127.
- Nichols, W. W., S. M. Dorrington, et al. (1988). "Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate." *Antimicrob Agents Chemother* **32**(4): 518-523.
- Nickel, J. C., I. Ruseska, et al. (1985). "Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material." *Antimicrob Agents Chemother* **27**(4): 619-624.
- Nordmann, P. and M. Guibert (1998). "Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Antimicrob Chemother* **42**(2): 128-131.

- Nordmann, P. and L. Poirel (2002). "Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes." *Clin Microbiol Infect* **8**(6): 321-331.
- O'Malley, Y. Q., K. J. Reszka, et al. (2004). "Pseudomonas aeruginosa pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**(1): L94-103.
- Okazaki, T. and K. Hirai (1992). "Cloning and nucleotide sequence of the Pseudomonas aeruginosa nfxB gene, conferring resistance to new quinolones." *FEMS Microbiol Lett* **76**(1-2): 197-202.
- Okii, M., S. Iyobe, et al. (1983). "Mapping of the gene specifying aminoglycoside 3'-phosphotransferase II on the Pseudomonas aeruginosa chromosome." *J Bacteriol* **155**(2): 643-649.
- Osaki, T., H. Suzuki, et al. (2009). "Multichannel simultaneous measurements of single-molecule translocation in alpha-hemolysin nanopore array." *Anal Chem* **81**(24): 9866-9870.
- Ota, S., H. Suzuki, et al. (2011). "Microfluidic lipid membrane formation on microchamber arrays." *Lab Chip* **11**(15): 2485-2487.
- Pages, J. M., M. Masi, et al. (2005). "Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria." *Trends Mol Med* **11**(8): 382-389.
- Pai, H., J. Kim, et al. (2001). "Carbapenem resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(2): 480-484.
- Pechere, J. C. and T. Kohler (1999). "Patterns and modes of beta-lactam resistance in Pseudomonas aeruginosa." *Clin Microbiol Infect* **5 Suppl 1**: S15-S18.
- Pei, X. Y., P. Hinchliffe, et al. (2011). "Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 2112-2117.
- Pesci, E. C., J. B. Milbank, et al. (1999). "Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of Pseudomonas aeruginosa." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11229-11234.
- Phan, G., H. Benabdelhak, et al. (2010). "Structural and dynamical insights into the opening mechanism of P. aeruginosa OprM channel." *Structure* **18**(4): 507-517.
- Phan, G., H. Remaut, et al. (2011). "Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC-FimH substrate." *Nature* **474**(7349): 49-53.
- Philippon, L. N., T. Naas, et al. (1997). "OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(10): 2188-2195.
- Poirel, L., T. Naas, et al. (2010). "Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(1): 24-38.
- Poirel, L., E. Ronco, et al. (1999). "Extended-spectrum beta-lactamase TEM-4 in Pseudomonas aeruginosa." *Clin Microbiol Infect* **5**(10): 651-652.
- Poole, K. (2005). "Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(2): 479-487.
- Poole, K., N. Gotoh, et al. (1996). "Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa." *Mol Microbiol* **21**(4): 713-724.
- Qu, T. T., J. L. Zhang, et al. (2009). "Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa strains in China." *J Clin Microbiol* **47**(4): 1136-1142.
- Quale, J., S. Bratu, et al. (2006). "Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(5): 1633-1641.

- Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky (2010). "Aminoglycoside modifying enzymes." Drug Resist Updat **13**(6): 151-171.
- Ramos, J. L., M. Martinez-Bueno, et al. (2005). "The TetR family of transcriptional repressors." Microbiol Mol Biol Rev **69**(2): 326-356.
- Read, R. C., P. Roberts, et al. (1992). "Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating." J Appl Physiol **72**(6): 2271-2277.
- Reffay, M., Y. Gambin, et al. (2009). "Tracking membrane protein association in model membranes." PLoS One **4**(4): e5035.
- Reisinger, V. and L. A. Eichacker (2008). "Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE." J Proteomics **71**(3): 277-283.
- Rella, M. and D. Haas (1982). "Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO to nalidixic acid and low levels of beta-lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes." Antimicrob Agents Chemother **22**(2): 242-249.
- Rivera, M., R. E. Hancock, et al. (1988). "Enhanced binding of polycationic antibiotics to lipopolysaccharide from an aminoglycoside-supersusceptible, tolA mutant strain of *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **32**(5): 649-655.
- Saito, K., S. Eda, et al. (2001). "Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*." FEMS Microbiol Lett **195**(1): 23-28.
- Saito, K., H. Yoneyama, et al. (1999). "nalB-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome." FEMS Microbiol Lett **179**(1): 67-72.
- Sakyo, S., H. Tomita, et al. (2006). "Potency of carbapenems for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*: the high potency of a new carbapenem doripenem." J Antibiot (Tokyo) **59**(4): 220-228.
- Samartzidou, H. and A. H. Delcour (1999). "Distinct sensitivities of OmpF and PhoE porins to charged modulators." FEBS Lett **444**(1): 65-70.
- Sanschagrin, F., N. Bejaoui, et al. (1998). "Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **42**(8): 1966-1972.
- Sanschagrin, F., F. Couture, et al. (1995). "Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **39**(4): 887-893.
- Sato, H., J. B. Feix, et al. (2005). "Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU." J Bacteriol **187**(3): 1192-1195.
- Sato, H., D. W. Frank, et al. (2003). "The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU." EMBO J **22**(12): 2959-2969.
- Schagger, H., W. A. Cramer, et al. (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." Anal Biochem **217**(2): 220-230.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**(2): 223-231.
- Schuldiner, S. (2006). "Structural biology: the ins and outs of drug transport." Nature **443**(7108): 156-157.
- Schulz, R. and U. Kleinekathofer (2009). "Transitions between closed and open conformations of TolC: the effects of ions in simulations." Biophysical Journal **96**(8): 3116-3125.
- Seeger, M. A., A. Schiefner, et al. (2006). "Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism." Science **313**(5791): 1295-1298.

- Seeger, M. A., C. von Ballmoos, et al. (2008). "Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB." *Nat Struct Mol Biol* **15**(2): 199-205.
- Sennhauser, G., P. Amstutz, et al. (2007). "Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPIn inhibitors." *PLoS Biol* **5**(1): e7.
- Sennhauser, G., M. A. Bukowska, et al. (2009). "Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Mol Biol* **389**(1): 134-145.
- Shannon, K., A. King, et al. (1982). "Development of resistance to beta-lactam antibiotics during therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections." *Lancet* **1**(8287): 1466.
- Shaver, C. M. and A. R. Hauser (2004). "Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung." *Infect Immun* **72**(12): 6969-6977.
- Shiba, T., K. Ishiguro, et al. (1995). "Purification and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* NfxB protein, the negative regulator of the nfxB gene." *J Bacteriol* **177**(20): 5872-5877.
- Shigeta, M., G. Tanaka, et al. (1997). "Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method." *Chemotherapy* **43**(5): 340-345.
- Skiada, A., A. Markogiannakis, et al. (2011). "Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*." *Int J Antimicrob Agents* **37**(3): 187-193.
- Smith, A. W. and B. H. Iglewski (1989). "Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation." *Nucleic Acids Res* **17**(24): 10509.
- Smith, E. E., D. G. Buckley, et al. (2006). "Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22): 8487-8492.
- Sobel, M. L., D. Hocquet, et al. (2005). "Mutations in PA3574 (nalD) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(5): 1782-1786.
- Sobel, M. L., G. A. McKay, et al. (2003). "Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(10): 3202-3207.
- Srikumar, R., X. Z. Li, et al. (1997). "Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **179**(24): 7875-7881.
- Srikumar, R., C. J. Paul, et al. (2000). "Influence of mutations in the mexR repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **182**(5): 1410-1414.
- Stegmeier, J. F., G. Polleichtner, et al. (2006). "Importance of the adaptor (membrane fusion) protein hairpin domain for the functionality of multidrug efflux pumps." *Biochemistry* **45**(34): 10303-10312.
- Steller, L., M. Kreir, et al. (2012). "Natural and artificial ion channels for biosensing platforms." *Anal Bioanal Chem* **402**(1): 209-230.
- Stonehouse, M. J., A. Cota-Gomez, et al. (2002). "A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C." *Mol Microbiol* **46**(3): 661-676.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, et al. (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." *Nature* **406**(6799): 959-964.
- Strateva, T. and D. Yordanov (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance." *J Med Microbiol* **58**(Pt 9): 1133-1148.
- Su, C. C., M. Li, et al. (2006). "Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway." *J Bacteriol* **188**(20): 7290-7296.
- Su, C. C., F. Long, et al. (2011). "Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*." *Nature* **470**(7335): 558-562.

- Su, C. C., F. Yang, et al. (2009). "Crystal structure of the membrane fusion protein CusB from *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **393**(2): 342-355.
- Sugawara, E., E. M. Nestorovich, et al. (2006). "Pseudomonas aeruginosa porin OprF exists in two different conformations." *J Biol Chem* **281**(24): 16220-16229.
- Sugawara, E. and H. Nikaido (1992). "Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **267**(4): 2507-2511.
- Sugawara, E. and H. Nikaido (1994). "OmpA protein of *Escherichia coli* outer membrane occurs in open and closed channel forms." *J Biol Chem* **269**(27): 17981-17987.
- Sugawara, E. and H. Nikaido (1997). "Only oligomeric forms of low efficiency porins OMPA and OPRF appear to contain open channels." *Biophysical Journal* **72**(2): Tupm2-Tupm2.
- Sulavik, M. C., L. F. Gambino, et al. (1995). "The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds." *Mol Med* **1**(4): 436-446.
- Sun, J. and J. T. Barbieri (2003). "Pseudomonas aeruginosa ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins." *J Biol Chem* **278**(35): 32794-32800.
- Suzuki, H., K. V. Tabata, et al. (2006). "Highly reproducible method of planar lipid bilayer reconstitution in polymethyl methacrylate microfluidic chip." *Langmuir* **22**(4): 1937-1942.
- Suzuki, H., K. V. Tabata, et al. (2007). "Electrophysiological recordings of single ion channels in planar lipid bilayers using a polymethyl methacrylate microfluidic chip." *Biosens Bioelectron* **22**(6): 1111-1115.
- Symmons, M. F., E. Bokma, et al. (2009). "The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(17): 7173-7178.
- Takahashi, I., K. Tsukamoto, et al. (1983). "Carbenicillin-hydrolyzing penicillinases of *Proteus mirabilis* and the PSE-type penicillinases of *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiol Immunol* **27**(12): 995-1004.
- Tamura, N., S. Murakami, et al. (2005). "Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking." *Biochemistry* **44**(33): 11115-11121.
- Tikhonova, E. B., V. Dastidar, et al. (2009). "Kinetic control of TolC recruitment by multidrug efflux complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(38): 16416-16421.
- Tikhonova, E. B., Q. Wang, et al. (2002). "Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria." *J Bacteriol* **184**(23): 6499-6507.
- Tikhonova, E. B., Y. Yamada, et al. (2011). "Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC." *Chem Biol* **18**(4): 454-463.
- Tikhonova, E. B. and H. I. Zgurskaya (2004). "AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex." *J Biol Chem* **279**(31): 32116-32124.
- Toleman, M. A., A. M. Simm, et al. (2002). "Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme." *J Antimicrob Chemother* **50**(5): 673-679.
- Touze, T., J. Eswaran, et al. (2004). "Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system." *Mol Microbiol* **53**(2): 697-706.
- Trias, J. and H. Nikaido (1990). "Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **34**(1): 52-57.

- Tsubery, H., H. Yaakov, et al. (2005). "Neopeptide antibiotics that function as opsonins and membrane-permeabilizing agents for gram-negative bacteria." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3122-3128.
- Vaccaro, L., V. Koronakis, et al. (2006). "Flexibility in a drug transport accessory protein: molecular dynamics simulations of MexA." Biophysical Journal **91**(2): 558-564.
- Vaccaro, L., K. A. Scott, et al. (2008). "Gating at both ends and breathing in the middle: conformational dynamics of TolC." Biophysical Journal **95**(12): 5681-5691.
- Vallet, I., J. W. Olson, et al. (2001). "The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6911-6916.
- Van Delden, C. and B. H. Iglewski (1998). "Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections." Emerg Infect Dis **4**(4): 551-560.
- Vediyappan, G., T. Borisova, et al. (2006). "Isolation and characterization of VceC gain-of-function mutants that can function with the AcrAB multiple-drug-resistant efflux pump of *Escherichia coli*." J Bacteriol **188**(11): 3757-3762.
- Verchere, A., I. Broutin, et al. (2012). "Photo-induced proton gradients for the in vitro investigation of bacterial efflux pumps." Sci Rep **2**: 306.
- Vogne, C., J. R. Aires, et al. (2004). "Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis." Antimicrob Agents Chemother **48**(5): 1676-1680.
- Wall, D. and D. Kaiser (1999). "Type IV pili and cell motility." Mol Microbiol **32**(1): 1-10.
- Walters, M. C., 3rd, F. Roe, et al. (2003). "Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin." Antimicrob Agents Chemother **47**(1): 317-323.
- Wang, B., J. Weng, et al. (2012). "Interdomain flexibility and pH-induced conformational changes of AcrA revealed by molecular dynamics simulations." J Phys Chem B **116**(10): 3411-3420.
- Wang, W., L. Monlezun, et al. (2012). "Activity monitoring of functional OprM using a biomimetic microfluidic device." Analyst **137**(4): 847-852.
- Welch, A., C. U. Awah, et al. (2010). "Promiscuous partnering and independent activity of MexB, the multidrug transporter protein from *Pseudomonas aeruginosa*." Biochem J **430**(2): 355-364.
- Weldhagen, G. F., L. Poirel, et al. (2003). "Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2385-2392.
- Westbrock-Wadman, S., D. R. Sherman, et al. (1999). "Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability." Antimicrob Agents Chemother **43**(12): 2975-2983.
- Whiteley, M., M. G. Bangera, et al. (2001). "Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Nature **413**(6858): 860-864.
- Wick, M. J., D. W. Frank, et al. (1990). "Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A." Annu Rev Microbiol **44**: 335-363.
- Williams, K. (1997). "Interactions of polyamines with ion channels." Biochem J **325** (Pt 2): 289-297.
- Williams, K. (1997). "Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines." Cell Signal **9**(1): 1-13.
- Wittig, I., H. P. Braun, et al. (2006). "Blue native PAGE." Nat Protoc **1**(1): 418-428.

- Wong, K. K., F. S. Brinkman, et al. (2001). "Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance." *J Bacteriol* **183**(1): 367-374.
- Wright, G. D. (1999). "Aminoglycoside-modifying enzymes." *Curr Opin Microbiol* **2**(5): 499-503.
- Xu, Y., M. Lee, et al. (2011). "Funnel-like hexameric assembly of the periplasmic adapter protein in the tripartite multidrug efflux pump in gram-negative bacteria." *J Biol Chem* **286**(20): 17910-17920.
- Xu, Y., A. Moeller, et al. (2012). "Assembly and channel opening of outer membrane protein in tripartite drug efflux pumps of Gram-negative bacteria." *J Biol Chem* **287**(15): 11740-11750.
- Xu, Y., S. H. Sim, et al. (2010). "The tip region of the MacA alpha-hairpin is important for the binding to TolC to the *Escherichia coli* MacAB-TolC pump." *Biochem Biophys Res Commun* **394**(4): 962-965.
- Xu, Y., S. Song, et al. (2011). "Functional implications of an intermeshing cogwheel-like interaction between TolC and MacA in the action of macrolide-specific efflux pump MacAB-TolC." *J Biol Chem* **286**(15): 13541-13549.
- Yahr, T. L., A. J. Vallis, et al. (1998). "ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13899-13904.
- Yamamoto, M., A. Ueda, et al. (2009). "Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of mexXY in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* **155**(Pt 10): 3312-3321.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, et al. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene* **33**(1): 103-119.
- Yin, P., C. J. Burns, et al. (2003). "A tethered bilayer sensor containing alamethicin channels and its detection of amiloride based inhibitors." *Biosens Bioelectron* **18**(4): 389-397.
- Yokoyama, K., Y. Doi, et al. (2003). "Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*." *Lancet* **362**(9399): 1888-1893.
- Yoneyama, H., H. Maseda, et al. (2000). "Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA, B-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane." *J Biol Chem* **275**(7): 4628-4634.
- Yoneyama, H. and T. Nakae (1993). "Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **37**(11): 2385-2390.
- Yoneyama, H., A. Ocaktan, et al. (1998). "Subunit swapping in the Mex-extrusion pumps in *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochem Biophys Res Commun* **244**(3): 898-902.
- Yoshimura, F., L. S. Zalman, et al. (1983). "Purification and properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin." *J Biol Chem* **258**(4): 2308-2314.
- Yu, E. W., J. R. Aires, et al. (2005). "A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study." *J Bacteriol* **187**(19): 6804-6815.
- Yu, E. W., G. McDermott, et al. (2003). "Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump." *Science* **300**(5621): 976-980.
- Yum, S., Y. Xu, et al. (2009). "Crystal structure of the periplasmic component of a tripartite macrolide-specific efflux pump." *J Mol Biol* **387**(5): 1286-1297.
- Zagnoni, M. (2012). "Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems." *Lab Chip* **12**(6): 1026-1039.

- Zeng, L. and S. Jin (2003). "aph(3')-IIb, a gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, is under the positive control of surrogate regulator HpaA." Antimicrob Agents Chemother **47**(12): 3867-3876.
- Zgurskaya, H. I. and H. Nikaido (1999). "AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm." J Mol Biol **285**(1): 409-420.
- Zgurskaya, H. I. and H. Nikaido (2000). "Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*." J Bacteriol **182**(15): 4264-4267.
- Zhao, W. H. and Z. Q. Hu (2010). "Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." Crit Rev Microbiol **36**(3): 245-258.

Nikaido, H. and R.E.W. Hancock. 1986. Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*. In (Sokatch, J.R., ed.) *The Bacteria: A treatise on structure and function*. X. pp. 145-193. Academic Press, London.

ANNEXES

Les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*

Jean-Marie Pagès^{a,°}, Laura Monlezun^{b,°}, Isabelle Broutin^{b,°}, Anne Davin-Regli^{a,°,*}

RÉSUMÉ

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène important en médecine humaine et il est surtout associé aux infections rencontrées chez les patients hospitalisés. La faible perméabilité de sa membrane externe, l'expression de pompes d'efflux et son adaptation rapide à la présence d'antibiotiques sont autant d'obstacles majeurs dans le traitement des infections. Le mécanisme d'efflux MexAB-OprM est avec AcrAB-TolC l'archétype des pompes d'efflux à trois composants couramment rencontrées chez les isolats résistants des bactéries à Gram négatif. Les travaux concernant la résolution de la structure de la pompe et de ses composants, son assemblage, et les bases moléculaires du transport des molécules reconnues ont permis de proposer des modèles pour tenter de comprendre le fonctionnement de ce complexe membranaire expulsant les agents antibactériens. Durant ces dernières années, ces données ont été la base de la synthèse et de la sélection de nouvelles molécules destinées à bloquer ces mécanismes de résistance par efflux.

***Pseudomonas aeruginosa* – multirésistance – pompes d'efflux – antibiotiques – MexAB-OprM – inhibiteurs de l'efflux.**

1. Introduction

P. aeruginosa fait partie des trois bactéries les plus souvent impliquées dans les infections opportunistes en médecine humaine [1, 2]. Il est largement impliqué dans les infections nosocomiales, en occupant le 1^{er} rang des bactéries

SUMMARY

Resistance and efflux mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa is a nosocomial and community-acquired pathogen associated with considerable patient morbidity and mortality. Multidrug resistance in *P. aeruginosa* is a concern owing to the limited therapeutic options available to treat infections due to this organism. The continuous dissemination of «multi-drug resistant» (MDR) bacteria drastically reduces the efficacy of our antibiotic «arsenal» and consequently increases the frequency of therapeutic failure. In *Pseudomonas aeruginosa* MDR bacteria the over-expression of efflux pumps, as MexAB-OprM, expel structurally-unrelated antibiotics decreasing their intracellular concentration. Several clinical data indicate an increasing contribution of efflux pumps in the emergence and dissemination of resistant Gram-negative bacteria. It is necessary to clearly define the molecular and genetic bases of the efflux pump in order to understand the translocation of antibiotic molecules through the efflux transporter and to combat this mechanism.

***Pseudomonas aeruginosa* – multi-drug resistance – efflux pumps – antibiotics – MexAB-OprM – efflux pumps inhibitors.**

a UMR-MD-1 – Transporteurs membranaires, chimiorésistance et drug design

Facultés de médecine et de pharmacie
Université de la Méditerranée
27, bd Jean-Moulin
13385 Marseille cedex 05

b Laboratoire de cristallographie et RMN biologiques

Université Paris-Descartes – Sorbonne Paris Cité – UMR 8015 CNRS
Faculté de pharmacie
4, av. de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06

[°] Ces auteurs ont contribué de manière similaire

* Correspondance

anne-veronique.regli@univmed.fr

pathogènes responsables d'infections respiratoires basses et le 3^e en matière d'infections urinaires en Europe [3-5]. À côté de la faible perméabilité de sa membrane externe, l'expression de plusieurs systèmes d'efflux, dont l'activité a été rapportée pour la première fois en 1994, lui permet de résister à divers antibiotiques et biocides [6]. Cette résistance par efflux est associée à une rapide adaptation en réponse aux antibactériens présents dans l'environnement et caractérise ce pathogène qui pose un problème sérieux dans le traitement des infections bactériennes [1, 7]. Les *Pseudomonas* multirésistants représentent 10 % de l'ensemble des bactéries multirésistantes ou BMR. Par ailleurs, la plupart des isolats de *P. aeruginosa* détectés lors d'infections sont capables de produire des facteurs invasifs et des toxines impliqués dans l'attachement, la colonisation et l'invasion des surfaces cellulaires (biofilms) et dans la sécrétion de nombreux facteurs de virulence. Le génome de *P. aeruginosa* est parmi les plus gros génomes bactériens et permet l'expression d'un grand nombre de protéines impliquées dans la régulation, le transport, la virulence et la résistance ; cette capacité assure

article reçu le 12 juillet, accepté le 27 juillet 2011

© 2011 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Tableau I – Pompes d'efflux et résistance.

Agents antibactériens	Pompes d'efflux							
	MexAB	MexCD	MexEF	MexGH	MexJK	MexXY	MexVW	TriABC
Pénicillines	+	+				+		
Céphalosporines	+					+		
Aztréonam	+	+						
Céfépime		+				+		
Imipénème								
Méropénème	+					+		
Aminoglycosides						+		
Fluoroquinolones	+	+	+	+	+	+	+	
Triméthoprim	+	+	+					
Chloramphénicol	+	+	+					
Tétracycline	+	+	+		+			
Triclosan	+	+	+		+			+

Les mécanismes d'efflux impliqués en clinique sont présentés en fonction des différentes classes d'antibactériens. Ces pompes sont associées à d'autres mécanismes (perte de porine, enzymes, etc.) contribuant au phénotype MDR.

une adaptation et une flexibilité importante à la bactérie [8, 9]. Plusieurs gènes, associés en opéron, codant pour des éléments de pompes d'efflux ont été caractérisés chez *P. aeruginosa* (tableau I).

2. Résistance aux antibiotiques et perméabilité membranaire chez *P. aeruginosa*

P. aeruginosa présente une résistance naturelle aux antibiotiques importante; elle est conférée par la faible perméabilité de sa membrane externe, l'expression constitutive de mécanismes d'efflux et la production d'enzymes inactivant les antibiotiques avec plusieurs nouvelles activités décrites récemment (e.g., céphalosporinases, oxacillinases, β -lactamases à large spectre, carbapénémases, métallo- β -lactamases ou enzymes modifiant les aminoglycosides) chez les isolats cliniques décrits en Europe. Certaines enzymes sont détectées chez les *Enterobacteriaceae* et d'autres plus spécifiques de *P. aeruginosa*. Les mutations de cible sont aussi fréquentes, particulièrement dans l'ADN gyrase et la topoisomérase IV [10, 11]. Tous ces mécanismes sont souvent actifs en même temps aboutissant à des phénotypes de multirésistance. Il faut aussi noter la production de biofilms par cette bactérie, ce qui constitue une barrière supplémentaire dans l'accessibilité de l'antibactérien à la cible, et favorise la colonisation et la dissémination de souches résistantes sur divers supports médicaux (greffes, cathéters, etc.) [1, 12, 13].

La surveillance des infections à *P. aeruginosa* a montré un niveau inquiétant de résistance aux antibiotiques évoluant vers un phénotype de résistance multiple (MultiDrug Resistance). La fréquence des *P. aeruginosa* MDR a fortement augmenté dans le monde et peut atteindre

20 % dans les unités de soins intensifs [14-16]. *P. aeruginosa* semble être le meilleur modèle permettant de corrélérer le bon usage des antibiotiques et l'évolution de la multi-résistance, du fait de son adaptation rapide à la pression de sélection antibiotique et son réservoir essentiellement environnemental [10, 11]. Chez *P. aeruginosa*, l'impact des pompes d'efflux sur le niveau de résistance est important étant donné la faible diffusion des antibactériens apportée par les porines majeures, qui présentent des capacités de transport beaucoup plus faibles que les porines des entérobactéries [17, 18]. Cette caractéristique membranaire, qui diminue drastiquement la concentration intracellulaire en antibiotique, est le support d'une résistance intrinsèque plus élevée. Néanmoins, l'utilisation de perméabilisants de la membrane externe provoque une augmentation significative de la sensibilité, en particulier pour les molécules plus importantes, hydrophiles et lipophiles [19]. Il est aussi intéressant de noter que parmi les perméabilisants proposés on retrouve les polymyxines qui sont des substrats des pompes d'efflux comme beaucoup de peptides antibactériens cationiques, mais aussi des détergents et surfactants, ainsi que des agents chaotropiques [20-23]. Plusieurs études cliniques ont montré l'existence d'une relation étroite entre l'émergence de souches surproduisant la pompe MexXY-OprM et l'utilisation des aminoglycosides, des fluoroquinolones et des céphalosporines anti-*Pseudomonas* lors du traitement de patients infectés [24-26]. La production de cette pompe confère de plus un niveau de résistance contre les molécules appartenant à d'autres familles d'antibiotiques [27-29]. En parallèle, plusieurs travaux rapportent l'importance des différentes pompes dans la résistance aux quinolones [1, 30, 31] (tableau I). Ces pompes d'efflux jouent un rôle certain dans le niveau de sensibilité aux antibiotiques en modulant la concentration intracellulaire, et en permettant aux bactéries d'acquérir d'autres mécanismes [11].

3. Les pompes d'efflux

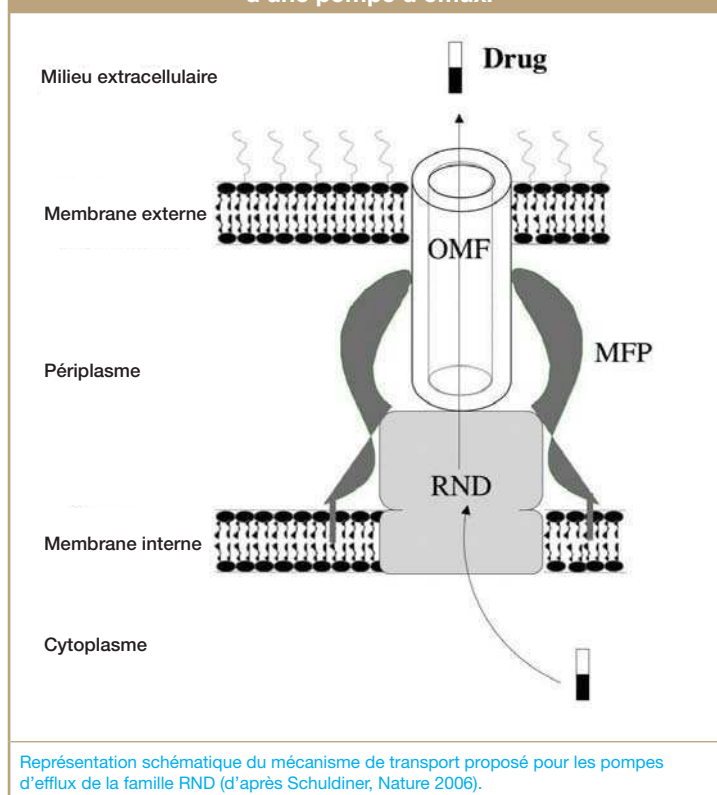
Le séquençage entier du génome de *P. aeruginosa* a permis d'identifier des gènes codant pour plusieurs pompes d'efflux dont 12 codant pour un transporteur de type RND, et l'implication de quatre d'entre elles a été prouvée dans la résistance aux antibiotiques. Chacune de ces pompes est composée de trois protéines (**figure 1**): (1) une protéine de la membrane cytoplasmique de la famille RND (Resistance Nodulation cell Division: MexB, MexD, MexF, MexY) qui agit comme une pompe utilisant la force proto-motrice pour fonctionner et montrant une large spécificité pour les substrats à rejeter, (2) une seconde protéine, OMF (Outer Membrane Factor family: OprM, OprJ, OprN, OprM) qui est intégrée dans la membrane externe, (3) et une troisième protéine, MFP (Membrane Fusion Protein family: MexA, MexC, MexE, MexX) qui est localisée dans l'espace périplasmique. Elle assure l'association entre les deux autres et est fixée à la membrane interne par une accroche N-terminale.

Chez *P. aeruginosa*, le système MexAB-OprM est exprimé de manière constitutive, alors que l'expression des autres pompes dépend de régulateurs génétiques [32]. Ces pompes donnent lieu à différents phénotypes et confèrent la résistance à la plupart des β -lactamines, quinolones, aminoglycosides, macrolides, triméthoprime-sulfamides, tétracycline, chloramphénicol et l'érythromycine [33] (**tableau I**). Seule la pompe MexXY-OprM est capable d'expulser les aminoglycosides [34, 35]. L'efflux est habituellement considéré comme conférant un niveau de résistance faible à modéré, mais il joue un rôle majeur chez les isolats cliniques pour au moins trois raisons: (1) il diminue significativement le choix d'antibiotiques actifs (e.g. la surexpression de MexXY-OprM confère une résistance non seulement aux aminosides, mais aussi au céfepime et aux fluoroquinolones); (2) il peut coopérer avec les autres mécanismes (e.g. mutations ou sur-production de β -lactamases); (3) il favorise l'émergence de mutations sur les cibles en diminuant la concentration intra-bactérienne en antibiotiques [1, 24].

4. Structures tridimensionnelles des différentes protéines constituant la pompe

La détermination des structures cristallographiques de ces différentes protéines a apporté des informations majeures pour la compréhension de certains aspects du mécanisme de l'efflux du système RND. Même si les structures d'OprM, de MexA et de MexB, constituants de la seule pompe d'efflux formée de façon constitutive chez *P. aeruginosa*, sont disponibles désormais, la plupart des connaissances actuelles accumulées sur ces pompes ont été obtenues grâce à l'étude de AcrAB-TolC, qui est la pompe équiva-

Figure 1 – Représentation schématique d'une pompe d'efflux.



lente de MexAB-OprM chez *E. coli*. En effet, l'organisation structurale des différents composants de ces deux pompes est similaire, bien que l'identité de séquence entre protéines équivalentes ne soit pas toujours très élevée (55 %, 69 % et 19 % respectivement entre MexA-MexB-OprM et AcrA-AcrB-TolC).

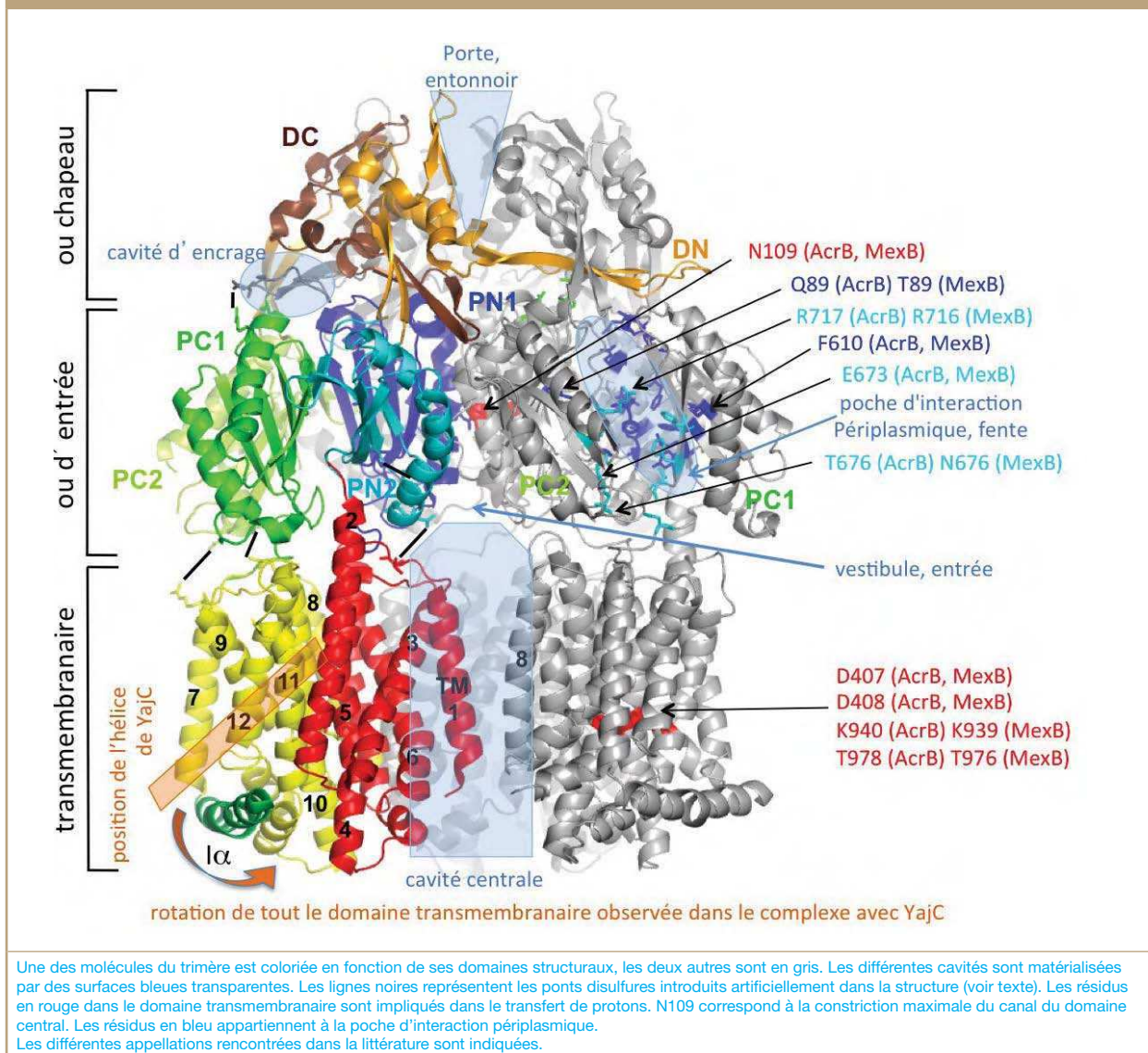
4.1. Les protéines RND: MexB et son homologue AcrB chez *E. coli*

4.1.1. Description de la structure

La première structure d'un transporteur de la famille RND à avoir été résolue est celle de la protéine AcrB chez *E. coli* [36]. Cette structure, obtenue à basse résolution (3,5 Å), montrait les trois protomères (monomères protéiques) reliés par un axe de symétrie cristallographique d'ordre trois, formant une structure ressemblant à une méduse. Chaque protomère est composé de trois domaines, un domaine transmembranaire d'environ 50 Å d'épaisseur, un domaine intermédiaire de 40 Å, et un dernier domaine de 30 Å chapeautant l'ensemble sur lequel est supposée interagir la protéine OMF.

Le domaine transmembranaire est formé de deux blocs de 6 hélices (TM1 à TM6 et TM7 à TM12) liés par un pseudo axe de symétrie d'ordre 2, reliés par une treizième hélice (α) couchée à la surface de la membrane cytoplasmique. Le trimère forme donc une large cavité de 30 Å d'ouverture côté cytoplasmique, rétrécie à 14 Å côté périplasmique par le rapprochement des hélices TM3 du trimère (**figure 2**).

Figure 2 – Représentation tridimensionnelle de la première structure de RND résolue (AcrB: code PDB (protéine data bank; <http://www.rcsb.org>) 1IWG).



Le domaine intermédiaire, également appelé le domaine du pore ou le domaine d'entrée, est composé de quatre sous-domaines (PN1, PN2, PC1 et PC2) (figure 2). Lorsque l'on regarde ce domaine perpendiculairement à la membrane, une profonde cavité de 15 Å apparaît sur toute la hauteur. Cette cavité verticale, appelée par la suite la poche d'interaction périplasmique, pourrait être un site d'interaction pour la protéine MFP (MexA), protéine ayant une forme allongée. C'est au niveau de ce domaine que le trimère est le plus resserré.

Le pore est totalement fermé ne permettant pas le passage de la moindre molécule. En revanche, ce pore est relié à une ouverture, appelée vestibule, présente au-dessus du domaine transmembranaire entre chaque paire de protomères.

Le dernier domaine relie les domaines PN2 et PC2 du domaine d'entrée. Ce « chapeau » présente une structure très particulière avec une base de feuillets bêta surmontée

d'hélices. L'un des feuillets est beaucoup plus long que les autres et pénètre dans le protomère voisin dans une cavité localisée entre le chapeau et les sous-domaines PN1 et PC1, faisant comme un crochet stabilisant l'édifice. Le trou formé par le trimère du chapeau se présente comme un entonnoir avec un diamètre d'ouverture extérieur du même ordre de grandeur que la partie périplasmique de la protéine OMF.

4.1.2. Premières hypothèses fonctionnelles concernant AcrB

La pompe d'efflux se présente donc comme un mécanisme comprenant trois composés organisés en 3 étages : passage de la membrane interne (cytoplasmique) et énergie du transport, traversée du périplasm, et enfin passage de la membrane externe. Cette organisation comporte une constriction au niveau du domaine central et plusieurs portes d'entrée possibles. Afin de comprendre le chemin

de l'efflux, différentes structures de la protéine AcrB ont été étudiées en complexe avec différentes molécules : la rhodamine 6G, le bromure d'éthidium, du déqualinium et la ciprofloxacine [37]. Dans chacune de ces structures, les molécules ont été localisées dans la grande cavité centrale, en interaction avec des acides aminés différents ; toutefois étant bloquées à l'entrée du pore, ces travaux n'apportaient pas d'information clef dans la compréhension du mécanisme. Afin de forcer l'ouverture du pore, l'acide aminé localisé au niveau de la fermeture maximale a été muté en alanine (AcrB-N109A) sans que cela n'affecte trop l'activité de la pompe [38]. La structure de ce mutant présente une ouverture de 3 Å au niveau du pore, et un élargissement de la poche d'interaction périplasmique. De nouvelles structures de complexes ont été déterminées entre cette protéine mutée et différentes molécules : la ciprofloxacine, la rhodamine 6G, la nafcilline, le bromure d'éthidium, et un inhibiteur de AcrB, le Phénylalanine-Arginine- β -Naphthylamide (PA β N). Ces dernières se retrouvent de nouveau dans la grande cavité transmembranaire à l'entrée du pore. Certaines molécules déjà incluses dans l'étude précédente réalisée sur la protéine sauvage montrent une position différente, suggérant une interaction avec des acides aminés différents dans la pompe. Toutefois, la structure des complexes montre également la présence de molécules dans la poche d'interaction périplasmique, sauf dans le cas de la rhodamine 6G et de la nafcilline. Afin de mettre en évidence les acides aminés de cette poche importants pour l'interaction avec les molécules effluées, ils ont été mutés un par un et leur activité biologique a été évaluée par des mesures de CMI [38]. Ces expériences ont montré une faible diminution de la résistance à certaines molécules, mais suffisante pour démontrer l'importance de la poche d'interaction périplasmique dans le mécanisme de l'efflux [39]. Ceci a été également confirmé par l'analyse de la localisation de mutations spontanées obtenues sur MexD conférant la capacité aux souches de *P. aeruginosa* d'expulser des β -lactamines di-anioniques (céfixime, ceftriaxone, carbénicilline, aztréonam, latamoxef, ceftazidime). Cette analyse a montré la localisation de certains de ces mutants dans cette même poche [40]. Les sels biliaires sont également efflués par ces pompes ; une structure de AcrB a été déterminée en complexe avec du déoxycholate, montrant que cette molécule est localisée au même niveau que la ciprofloxacine, l'éthidium et le PA β N dans cette poche périplasmique [41].

Ce n'est qu'en 2006, lorsque de nouvelles structures d'AcrB ont été obtenues dans des groupes d'espace différents [42-44] que le mécanisme de pompe péristaltique a pu être proposé. En effet, dans ces nouveaux empilements cristallins, les trois molécules formant le trimère ne sont pas liées par un axe de symétrie et peuvent donc adopter une structure différente et indépendante les unes des autres. L'analyse de la conformation des trois molécules du trimère a montré des différences importantes dans la structure, principalement dans le domaine d'entrée. Ces différences étaient d'autant plus marquées dans les structures des complexes formés avec la doxorubicine et la minocycline. Ces molécules ne se sont fixées qu'à un seul protomère, appelé le « binding » protomère, dans une large poche riche en résidus aromatiques formée des feuillets β

localisés entre les domaines PN2 et PC1 (*figure 2*). Dans cette configuration « binding », l'hélice centrale du domaine PN1, qui est localisée au cœur du pore, est inclinée de 15° par rapport à celle des deux autres protomères, bloquant la sortie de la poche dans laquelle est fixée la molécule du côté du pore central. En revanche, cette même poche est ouverte côté périplasmique.

Dans un autre protomère, la poche est fermée côté périplasmique mais pas du côté du pore et ne contient pas de molécule. Cette conformation illustrerait la situation obtenue juste après l'extrusion du substrat dans le canal TolC ou OprM, elle est donc appelée « *extrusion protomère* ». Enfin, la dernière sous-unité du trimère n'a pas sa poche occupée, ni ouverte du côté du pore, et est ouverte mais resserrée du côté périplasmique. Elle est supposée être dans un état d'attente du prochain substrat. Elle est donc appelée « *access* », ou protomère au repos [45].

Il semble donc que la poche d'interaction ne puisse pas être ouverte en même temps du côté périplasmique et du côté du pore.

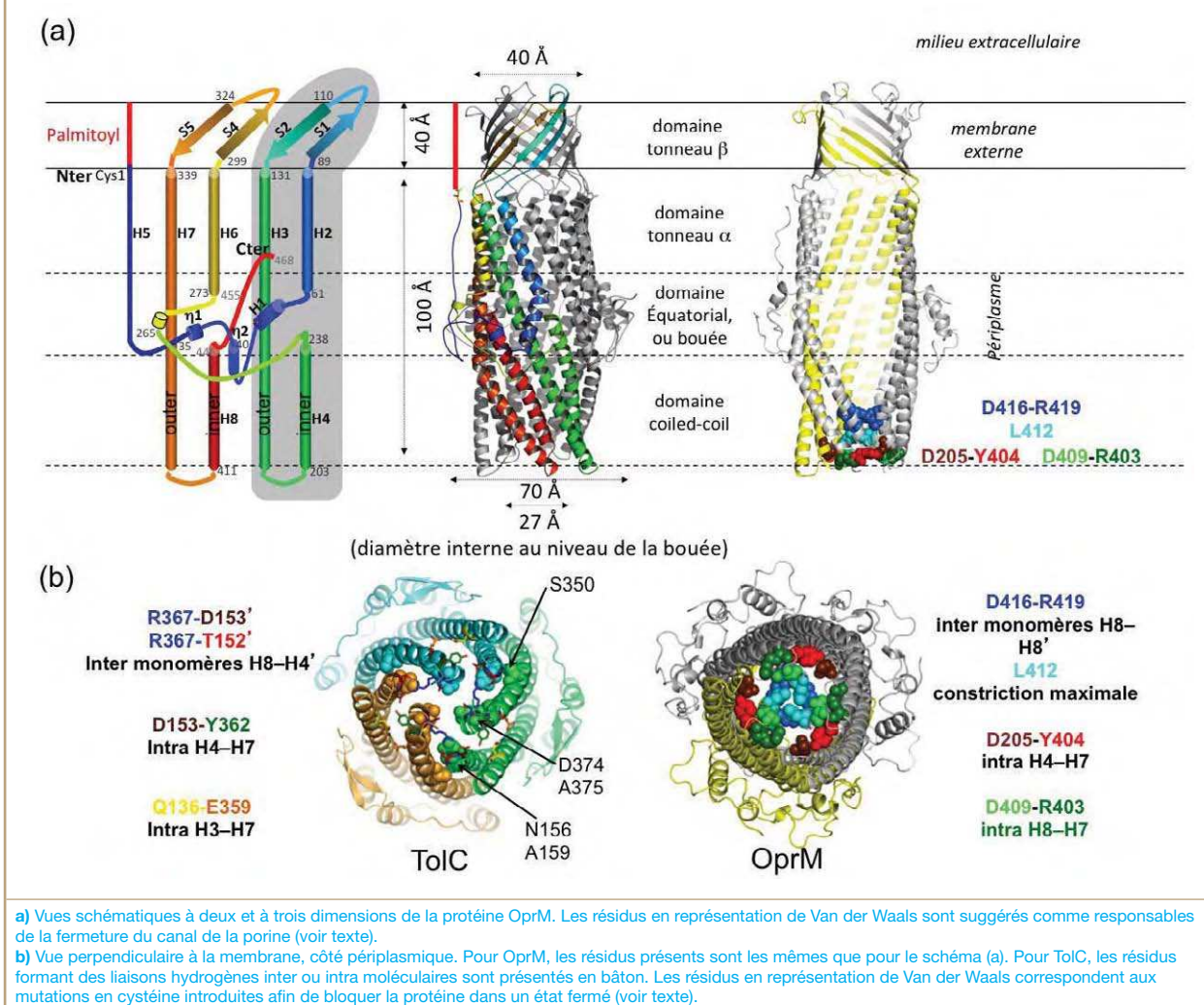
En ce qui concerne le domaine transmembranaire, contenant le chemin de translocation de protons (antiport), des différences sont également visibles, figurant une action combinée entre le chemin de translocation dans le domaine transmembranaire et le chemin d'extrusion dans le domaine central.

Ce modèle de pompe péristaltique a été testé in vivo par l'introduction de ponts disulfures destinés à bloquer le mouvement à l'interface des sous-domaines impliqués dans le mécanisme [46]. Cette pompe chimère présente une sensibilité augmentée pour des composés toxiques, et cet effet est aboli par ajout de DTT (dithio thréitol), un agent réducteur qui abolit les ponts disulfures. Une autre approche, par suivi de fluorescence d'acides aminés modifiés, a permis de mettre en évidence l'importance de 25 résidus, allant de l'entrée de la fente (*figure 2, protomère de droite cyan*) jusqu'au fond de la poche d'interaction (*bleu foncé*) et le bas de l'entonnoir (*vert*) [47].

Une autre approche reposant sur la construction d'un gène chimère géant où les 3 protomères d'AcrB sont reliés entre eux a été développée. Ainsi des expériences de mutagenèse affectant un seul des 3 protomères ont pu être mises en place pour étudier le mécanisme de pompe péristaltique [48]. L'introduction d'un pont disulfure fermant la poche d'interaction périplasmique dans un seul des protomères suffit à désactiver la pompe suggérant bien une coopérativité fonctionnelle entre les 3 protomères lors de l'expulsion des substrats.

Ces structures, couplées à des études par mutagenèse, ont donc permis de proposer un mécanisme d'efflux pour des molécules « capturées » au niveau de la membrane. En revanche, elles semblent interdire le passage direct du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Une nouvelle structure a mis en évidence l'importance de la partie N-terminale de AcrB, qui montre une séquence très conservée parmi les transporteurs de la famille RND [49]. Cette séquence N-terminale se présente soit sous une forme dépliée soit sous la forme d'une hélice selon les structures. Ce changement de conformation modifie le diamètre d'ouverture de la cavité centrale et pourrait jouer un rôle de filtre pour les molécules à expulser. Néanmoins, l'ouverture du pore

Figure 3 – Différentes représentations de la protéine OMF.



au niveau du domaine d'entrée n'est pas modifiée. Les molécules entreraient donc dans la grande cavité centrale puis passeraient dans le péripasme de manière passive, avant d'être prises en charge par le mécanisme de pompe péristaltique. Une autre possibilité est l'intervention d'autres pompes dans un système de transport coordonné : par exemple, MdfA ou EmrE situées dans la membrane interne transporteraient les molécules du cytoplasme dans le péripasme, puis AcrAB-TolC ou MexAB-OprM les prendraient en charge pour les expulser de la bactérie [50]. Ce n'est que plus récemment que la structure de MexB, la protéine RND de *P. aeruginosa*, a été résolue [51]. Quelques différences existent avec AcrB d'*E. coli*, principalement dans le monomère « access » et plus spécifiquement au niveau des sous-domaines TM6-TM12 et PC2, ce dernier se rapprochant à la fois du premier et de PC1 menant à une contraction de l'entrée de la poche d'interaction péripasme. Contrairement à AcrB, la poche est donc fermée dans la position « access ». Il semble donc qu'une certaine flexibilité soit nécessaire à la fonction de la pompe et l'on peut supposer que les changements de conformations

nécessaires dépendent de l'interaction avec la protéine partenaire MexA.

4.2. La protéine « canal » de la membrane externe, OprM

Des structures de cette famille de protéines ont été déterminées pour différentes bactéries, dont TolC chez *E. coli* et OprM chez *P. aeruginosa*. Elles présentent un repliement similaire malgré un faible pourcentage d'identité de séquence (inférieur à 20 %) [52, 53]. Le canal est constitué par l'assemblage de trois monomères, chacun présentant également une répétition interne. La partie membranaire du trimère est constituée d'un tonneau de feuillets β d'une épaisseur de 40 Å environ inséré dans la membrane externe. Le domaine péripasme ne présente que des hélices et s'étend sur plus de 100 Å (figure 3).

Dans les différentes structures publiées concernant ces canaux externes (obtenus sous forme de protéine purifiée isolée), les deux extrémités du pore sont fermées. Ceci n'est pas compatible avec leur rôle de canal de membrane externe dans l'efflux, ce qui semble indiquer qu'elles ne seraient

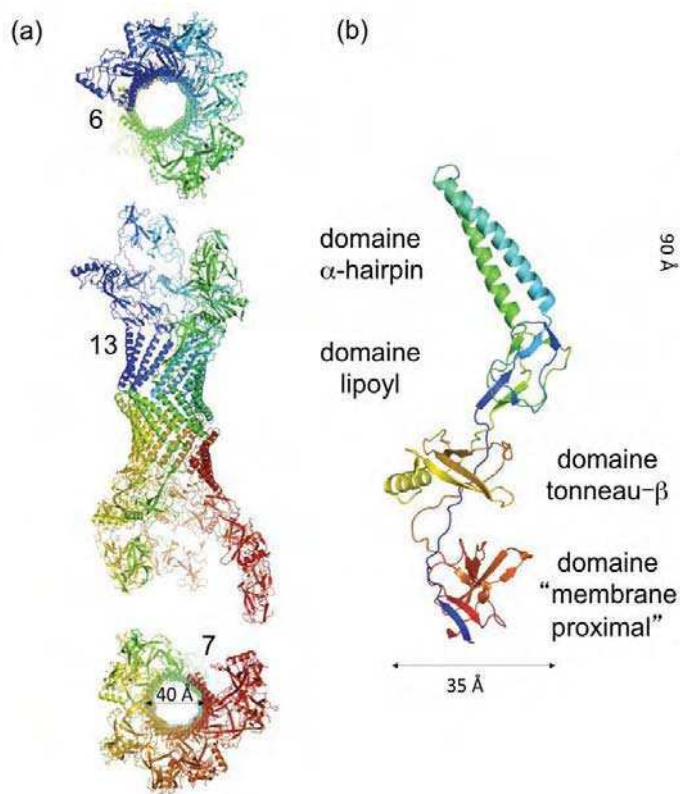
ouvertes que lorsqu'elles sont fonctionnellement associées avec les autres partenaires. Dès la première structure déterminée pour TolC, il a été suggéré que la protéine pouvait s'ouvrir selon un mouvement de diaphragme comme pour les appareils photos. Ceci reviendrait à écarter les segments d'hélice impliqués dans le domaine coiled-coil (**figure 3**). Plus tard, l'analyse par dynamique moléculaire vibrationnelle de la structure d'OprM a suggéré une ouverture par combinaison d'un mouvement de twist et d'un mouvement d'extension concernant la totalité de la protéine [53]. Ceci permettrait d'atteindre une ouverture d'environ 30 Å tout le long du canal, qui se terminerait par une ouverture du clapet formé par les boucles extracellulaires. De plus, cette analyse a mis en évidence une région de fermeture (ressemblant à un cadenas), localisée à l'extrémité périplasmique du pore, qui implique des résidus chargés formant des liaisons hydrogènes et même pour certains, des ponts salins. Les résidus impliqués dans ce cadenas diffèrent entre les protéines, mais ont tous pour effet de rigidifier les interactions entre les hélices internes et externes et/ou les trois monomères [53] (**figure 3b**). Plusieurs travaux montrent l'importance de la flexibilité de ces hélices lors du passage des molécules dans le canal [54-60].

En ce qui concerne la protéine OprM, équivalente de TolC chez *P. aeruginosa*, peu d'études concernant l'ouverture du canal ont été réalisées à ce jour [53]. On connaît l'importance de certains résidus dans l'ouverture de la protéine, qui bien que localisés dans la même région structurale que les résidus identifiés chez TolC, ne sont pas alignés en séquence. OprM possède un double pont salin inter-moléculaire à la sortie du pore, là où TolC présente une double couronne de résidus aspartates et donc aucune interaction inter-moléculaire [61]. Ces deux porines, bien que de structure très proche, présentent donc des différences locales qui peuvent avoir des conséquences fonctionnelles.

4.3. La protéine MFP, MexA

Cette protéine n'a pas de fonction active ou de canal (**figure 1**). Son rôle est de conforter et/ou stabiliser l'assemblage du complexe MexB-OprM. La première structure de MFP à avoir été résolue est celle de MexA chez *P. aeruginosa* [62, 63]. Le niveau d'oligomérisation dans l'unité asymétrique est étonnant, 13 molécules interagissant *via* leurs hélices pour former deux fers à cheval tête-bêche constitués de 6 et 7 MexA respectivement (**figure 4**). La structure d'une molécule de MexA a une forme allongée de 90 Å de long sur 35 Å de large et contient 4 domaines (**figure 4**) : un domaine formé de deux hélices en épingle à cheveux (α -hairpin), un domaine β formé d'un sandwich de deux fois quatre feuillets β , un domaine tonneau β (β -barrel) lié à une hélice α , structure souvent rencontrée dans des domaines impliqués dans la liaison à des ligands et pouvant donc être impliquée dans le transport des substrats, et un dernier domaine, très flexible dans le cristal, entièrement formé de feuillets β (membrane proximale). Tous ces domaines sont composés de deux parties éloignées en séquence, la protéine semblant être « pliée » au niveau de l'épingle à cheveux. L'ensemble des 7 plus 6 monomères forme un cylindre de 40 Å de diamètre constitué de l'interaction des hélices α , se terminant à chaque extrémité par une couronne évasée (**figure 4**).

Figure 4 – Représentation tridimensionnelle schématique de la protéine MFP.



a) Structure de MexA (MexA: code PDB 2V4D) avec 13 molécules par unité asymétrique, empilées en deux couronnes tête-bêche de 6 et 7 monomères respectivement, formant un cylindre de 40 Å de diamètre.

b) Représentation tridimensionnelle schématique d'un monomère de MexA, coloré en arc-en-ciel du N- vers le C-terminal, réparti en quatre domaines structuraux.

La structure de la protéine AcrA de *E. coli* a été déterminée avec un empilement cristallin totalement différent [64]. Elle se présente sous la forme d'un dimère de dimère. Les trois premiers domaines sont comparables à ceux de MexA, en revanche le domaine « membrane proximal » n'est pas visible dans la structure. La boucle reliant les deux hélices α du domaine α -hairpin est plus longue de 13 acides aminés par rapport à celle de la structure de MexA, ce qui doit certainement avoir une incidence dans l'interaction de ces MFP avec leur partenaire OMF respectif, l'assemblage étant supposé se faire *via* ce domaine. Depuis, d'autres structures de protéines MFP ont été résolues, telles que (1) CusB de *E. coli* qui fonctionne avec CusC et CusA transporteur spécifique responsable de l'expulsion d'atomes lourds tels que le cuivre et l'argent, (2) MacA de *E. coli* qui fonctionne avec TolC et MacB, transporteur de la famille ABC spécifique de l'efflux des macrolides, (3) ZneB de *Cupriavidus metallidurans* qui fonctionne avec ZneA et ZneC, pompe spécifique de l'efflux de métaux lourds tels que le zinc [65-67]. Toutes ces structures de protéines MFP présentent une organisation identique en 4 domaines comportant des différences locales, afin de permettre une meilleure adaptation à leur partenaire OMF respectif.

À partir de ces structures, différents modèles d'assemblage de la pompe entière ont été proposés. Il était admis que les protéines OMF et RND interagissaient ensemble sous forme de trimères, en revanche, personne ne savait combien de molécules de la protéine MFP étaient nécessaires pour obtenir une pompe fonctionnelle. Néanmoins, chaque modèle proposé a tenu à respecter cette symétrie 3. Les structures de MexA semblaient indiquer qu'il était possible de faire un tour complet en juxtaposant 9 molécules de MexA [62]. Il a même été suggéré que 12 molécules pouvaient entourer le complexe [63]. Ceci nécessiterait une adaptation de différentes orientations des domaines de MexA les uns par rapport aux autres, mais il a été montré que cette protéine était très flexible et donc capable de permettre un ajustement à la structure de son partenaire, ce qui paraît indispensable pour suivre les mouvements de pompe péristaltique de la protéine MexB [68]. Néanmoins, en tenant compte de toutes les données de la littérature, un niveau d'oligomérisation plus modeste de 6 [63] ou même 3 MexA [69, 70] par trimère de OprM/MexB semble plus réaliste.

5. Assemblage

Bien que plusieurs structures correspondant à chaque composant de la pompe aient été résolues chez différentes espèces bactériennes, le mécanisme de l'efflux et le niveau d'oligomérisation de la protéine MFP ne sont toujours pas connus. Beaucoup d'efforts ont été investis pour déterminer la structure du complexe, mais sans succès à ce jour. Vue de loin, la protéine de membrane externe pourrait sembler n'avoir qu'un rôle de pore, créant une porte de sortie à travers la membrane externe. Néanmoins, ces différentes protéines-canal de membrane externe ont des spécificités différentes vis-à-vis de leurs pompes respectives. OprM est capable d'interagir avec AcrAB mais la pompe n'est pas fonctionnelle [71, 72]. En revanche, TolC n'interagit pas avec MexA-MexB mais peut fonctionner avec AcrA-MexB [73]. TolC peut interagir avec le système VceAB et créer une pompe fonctionnelle, mais inversement VceC ne peut pas remplacer fonctionnellement TolC bien que l'assemblage soit possible [74]. Chez *P. aeruginosa*, OprM n'est pas seulement la porine de la pompe MexAB [75], mais également de MexXY et de MexJK [35, 76-78]. De plus, elle est capable de remplacer OprJ avec MexCD et OprN avec MexEF sans que cela n'affecte le profil d'élution des substrats de ces pompes [34, 79]. Inversement OprN n'est capable d'interagir qu'avec sa pompe MexEF [80]. Tout ceci semble indiquer qu'il existe des zones de reconnaissance spécifiques entre les différentes protéines de ces pompes et que l'élément MFP peut moduler, dans une certaine mesure, les associations entre des partenaires différents.

6. Conclusion

La pompe MexAB-OprM de *P. aeruginosa* et AcrAB-TolC de *Escherichia coli* sont les prototypes des pompes d'efflux à trois composants appartenant à la famille RND [81]. Leur contribution dans la résistance chez les

isolats cliniques a été largement démontrée et ainsi une stratégie basée sur l'inhibition de ces mécanismes d'efflux s'est construite afin de restaurer l'activité des antibiotiques substrats des pompes [21, 82]. Avec la résolution de la structure 3D des composants des pompes d'efflux et les divers modèles fonctionnels proposés, plusieurs molécules ont été testées afin de restaurer la sensibilité aux antibiotiques [82].

Ces molécules (EPIs pour «efflux pump inhibitors»), ne doivent pas avoir d'effet intrinsèque sur la bactérie mais permettre de restaurer la concentration intracellulaire de l'antibiotique reconnu et expulsé par la pompe d'efflux. Des molécules peptidomimétiques ont été étudiées sur des souches de *P. aeruginosa* produisant la pompe d'efflux MexAB et certaines d'entre elles sont capables de bloquer l'efflux de la lévofloxacine (utilisée comme marqueur du transport des fluoroquinolones) [83, 84]. Cette famille de peptidomimétiques a été largement développée et étudiée avec l'utilisation du MC-207,110, Phe-Arg- β -naphthylamine (PA β N) dans les études de différentes pompes d'efflux réalisées chez plusieurs espèces bactériennes [21]. Plusieurs dérivés ont été produits afin d'obtenir des molécules moins toxiques chez l'animal et plus stables in vivo. D'autres dérivés ont été produits par modifications chimiques et certains présentent une meilleure solubilité avec des activités biologiques conservées [21].

En conclusion, actuellement nos connaissances concernant les transporteurs bactériens de la famille Mex, impliqués dans l'efflux des antibiotiques chez *P. aeruginosa*, ont largement progressé au cours de ces dernières années. Les études se sont particulièrement amplifiées sur les régulateurs et activateurs impliqués dans l'expression des pompes ainsi que les paramètres biochimiques, mécanistiques et structuraux du transport. Ces travaux ont permis d'organiser une contre-attaque afin de neutraliser ce mécanisme de transport actif impliqué dans la résistance. Le développement de cette famille originale d'antibactériens ciblant les pompes d'efflux devrait permettre un diagnostic fonctionnel des activités d'efflux et à plus long terme le retour en thérapeutique de plusieurs antibiotiques substrats des pompes. À l'image des inhibiteurs de β -lactamases associés avec les β -lactamines qui représentent un exemple de combinaison utilisée actuellement, ces molécules s'associeraient à l'antibiotique pour restaurer son action. Plusieurs molécules appartenant à cette famille ont été produites et ont fait l'objet de brevet [85, 86]. Il est intéressant de noter que certaines de ces molécules sont déjà utilisées pour évaluer l'efflux et son expression, ainsi que l'évolution et la dissémination de l'efflux dans les isolats cliniques de *P. aeruginosa* [85].

Remerciements

Les études réalisées par les co-auteurs de cette revue sont soutenues par des financements de l'Université de la Méditerranée, du Service de Santé des Armées, de l'Université Paris Descartes, du CNRS, de Vaincre la mucoviscidose.

Déclaration d'intérêts: les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect 2007;13(6):560-78.
- [2] Fujitani S, Sun HY, Yu VL, et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. Chest 2011;139(4):909-19.
- [3] Roux D, Ricard J. Novel therapies for *Pseudomonas aeruginosa* pneumoniae. Infect Disord Drug Targets 2011; in press.
- [4] Fujitani S, Sun HY, Yu VL, et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. Chest 2011;139(4):909-19.
- [5] Siegel RE. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. Respir Care 2008;53(4):471-9.
- [6] Li XZ, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:1732-41.
- [7] de Bentzmann S, Plésiat P. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. Environ Microbiol 2011; in press.
- [8] Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev 2010;74(4):621-41.
- [9] Gooderham WJ, Hancock RE. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Rev 2009;33(2):279-94.
- [10] Barbier F, Wolff M. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end? Med Sci (Paris) 2010;26(11):960-8.
- [11] Davin-Regli A, Bolla JM, James CE, et al. Membrane permeability and regulation of drug «influx and efflux» in enterobacterial pathogens. Curr Drug Targets 2008;9(9):750-9.
- [12] Kunz AN, Brook I. Emerging resistant Gram-negative aerobic bacilli in hospital-acquired infections. Chemotherapy 2010;56(6):492-500.
- [13] Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. Int J Oral Sci 2011;3(2):55-65.
- [14] <http://www.pseudomonas.com/>
- [15] <http://www.biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>
- [16] Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2006;43:S49-56.
- [17] Sugawara E, Nestorovich EM, Bezrukov SM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. J Biol Chem 2006;281:16220-9.
- [18] Yoshimura F, Zalman LS, Nikaido H. Purification and properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin. J Biol Chem 1983;258:2308-14.
- [19] Nikaido H. The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access? Drug Resist Updat 1998;1:93-8.
- [20] Bolla JM, Alibert-Franco S, Handzlik J, et al. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. FEBS Lett 2011;585(11):1682-90.
- [21] Vaara M. Polymyxins and their novel derivatives. Curr Opin Microbiol 2010;13:574-81.
- [22] Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I, et al. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. Nat Rev Microbiol 2011;9:62-75.
- [23] Vooturi SK, Firestone SM. Synthetic membrane-targeted antibiotics. Curr Med Chem 2010;17:2292-300.
- [24] Hocquet D, Muller A, Blanc K, et al. Relationship between antibiotic use and incidence of MexXY-OprM overproducers among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:1173-5.
- [25] Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, et al. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1347-51.
- [26] Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo JD, et al. MexAB-OprM and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1582-3.
- [27] Beaudoin T, Aaron SD, Giesbrecht-Lewis T, et al. Characterization of clonal strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Ontario, Canada. Can J Microbiol 2010;56:548-57.
- [28] Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Morrow BJ, et al. Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(7):2785-90.
- [29] Peña C, Suarez C, Tubau F, et al. Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1 beta-lactamase. J Clin Microbiol 2009;47:2381-7.
- [30] Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res 2010;10(4):441-51.
- [31] Nikaido H, Pagès JM. Broad specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram negative bacteria. FEMS Microbiol Rev 2011; in press.
- [32] Nakajima A, Sugimoto Y, Yoneyama H, et al. High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation Microbiol Immunol 2002;46:391-5.
- [33] Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet Mol Res 2003;2:48-62.
- [34] Maseda H, Yoneyama H, Nakae T. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:658-64.
- [35] Westbrook-Wadman S, Sherman DR, Hickey MJ, et al. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2975-83.
- [36] Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, et al. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. Nature 2006;443:173-9.
- [37] Yu EW, McDermott G, Zgurskaya HI, et al. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. Science 2003;300:976-80.
- [38] Yu EW, Aires JR, McDermott G, Nikaido H. A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. J Bacteriol 2005;187:6804-15.
- [39] Middlemiss JK, Poole K. Differential impact of MexB mutations on substrate selectivity of the MexAB-OprM multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2004;186:1258-69.
- [40] Mao W, Warren MS, Black DS, et al. On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. Mol Microbiol 2002;46:889-901.
- [41] Drew D, Klepsch M M, Newstead S, et al. The structure of the efflux pump AcrB in complex with bile acid. Mol Membr Biol 2008;25:677-82.
- [42] Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, et al. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. Nature 2006;443:173-9.
- [43] Seeger MA, Schiefner A, Eicher T, et al. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. Science 2006;313:1295-8.
- [44] Sennhauser G, Amstutz P, Briand C, et al. Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPIn inhibitors. PLoS Biol 2007;5:e7.
- [45] Schuldiner S. Structural biology: the ins and outs of drug transport. Nature 2006;443:156-7.
- [46] Seeger MA, von Ballmoos C, Eicher T, et al. Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB. Nat Struct Mol Biol 2008;15:199-205.
- [47] Husain F, Nikaido H. Substrate path in the AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 2010;78:320-30.
- [48] Takatsuka Y, Nikaido H. Covalently linked trimer of the AcrB multidrug efflux pump provides support for the functional rotating mechanism. J Bacteriol 2009;191:1729-37.

- [49] Das D, Xu QS, Lee JY, et al. Crystal structure of the multidrug efflux transporter AcrB at 3.1 Å resolution reveals the N-terminal region with conserved amino acids. *J Struct Biol* 2007;158:494-502.
- [50] Tai N, Schuldiner S. A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(22):9051-6.
- [51] Sennhauser G, Bukowska MA, Briand C, et al. Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Molecul Biol* 2009;389:134-45.
- [52] Akama H, Kanemaki M, Yoshimura M, et al. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J Biol Chem* 2004;279:52816-9.
- [53] Phan G, Benabdelhak H, Lascombe MB, et al. Structural and dynamical insights into the opening mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* OprM channel. *Structure* 2010;18:507-17.
- [54] Andersen C, Koronakis E, Bokma E, et al. Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:11103-8.
- [55] Eswaran J, Hughes C, Koronakis V. Locking TolC entrance helices to prevent protein translocation by the bacterial type I export apparatus. *J Molecul Biol* 2003;327:309-15.
- [56] Higgins M, Eswaran J, Edwards P, et al. Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC. *J Molecul Biol* 2004;342:697-702.
- [57] Bavro VN, Pietra Z, Furnham N, et al. Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine. *Mol Cell* 2008;30:114-21.
- [58] Vaccaro L, Scott KA, Sansom MS. Gating at both ends and breathing in the middle: conformational dynamics of TolC. *Biophys J* 2008;95:5681-91.
- [59] Schulz R, Kleinekathofer U. Transitions between closed and open conformations of TolC: the effects of ions in simulations. *Biophys J* 2009;96:3116-3125.
- [60] Pei XY, Hinchliffe P, Symmons MF, et al. Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108: 2112-7.
- [61] Andersen C, Koronakis E, Hughes C, et al. An aspartate ring at the TolC tunnel entrance determines ion selectivity and presents a target for blocking by large cations. *Mol Microbiol* 2002;44:1131-9.
- [62] Higgins MK, Eswaran J, Edwards P, et al. Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC. *J Molecul Biol* 2004;342(3):697-702.
- [63] Akama H, Kanemaki M, Yoshimura M, et al. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J Biol Chem* 2004;279(51):52816-9.
- [64] Mikolosko J, Bobyk K, Zgurskaya HI, et al. Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure* 2006;14:577-87.
- [65] Su CC, Yang F, Long F, et al. Crystal structure of the membrane fusion protein CusB from *Escherichia coli*. *J Molecul Biol* 2009;393(2):342-55.
- [66] Yum S, Xu Y, Piao S, Sim SH, et al. Crystal structure of the periplasmic component of a tripartite macrolide-specific efflux pump. *J Molecul Biol* 2009;387(5):1286-97.
- [67] De Angelis F, Lee JK, O'Connell JD, 3rd, Miercke LJ, Verschueren KH, Srinivasan V, et al. Metal-induced conformational changes in ZneB suggest an active role of membrane fusion proteins in efflux resistance systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107(24):11038-43.
- [68] Vaccaro L, Koronakis V, Sansom MS. Flexibility in a drug transport accessory protein: molecular dynamics simulations of MexA. *Biophys J* 2006;91(2):558-64.
- [69] Fernandez-Recio J, Walas F, Federici L, et al. A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. *FEBS Letters* 2004;578(1-2):5-9.
- [70] Symmons MF, Bokma E, Koronakis E, et al. The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106(17):7173-8.
- [71] Tikhonova EB, Wang Q, Zgurskaya HI. Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 2002;184:6499-507.
- [72] Stegmeier JF, Pollechner G, Brandes N, et al. Importance of the adaptor (membrane fusion) protein hairpin domain for the functionality of multidrug efflux pumps. *Biochemistry* 2006;45:10303-12.
- [73] Welch A, Awah CU, Jing S, et al. Promiscuous partnering and independent activity of MexB, the multidrug transporter protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 2010;430:355-64.
- [74] Vedyappan G, Borisova T, Fralick JA. Isolation and characterization of VceC gain-of-function mutants that can function with the AcrAB multiple-drug-resistant efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2006;188:3757-62.
- [75] Yoneyama H, Ocaktan A, Gotoh N, et al. Subunit swapping in the Mex-extrusion pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:898-902.
- [76] Aires JR, Kohler T, Nikaido H, et al. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents Chemother* 1999;43:2624-28.
- [77] Mine T, Morita Y, Kataoka A, et al. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1999;43:415-7.
- [78] Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol* 2002;184:5036-44.
- [79] Gotoh N, Tsujimoto H, Nomura A, et al. Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Letters* 1998;165:21-7.
- [80] Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U, et al. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997;23:345-54.
- [81] Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 2009;69:1555-1623.
- [82] Pagès JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2009;1794: 826-33.
- [83] Renau TE, Léger R, Flamme EM, et al. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. *J Med Chem* 1999; 42:4928-31.
- [84] Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:105-16.
- [85] Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. *Biochem Pharmacol* 2006;71:910-8.
- [86] Van Bambeke F, Pagès JM, Lee VJ. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibacterial therapy and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery* 2010;1:138-175.